



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

생활과학박사학위논문

고지방식이로 유도한 비만마우스에서
비타민 D 섭취 수준이
비타민 D 대사와 지방조직 염증반응에
미치는 영향

**Effects of Vitamin D Supplementation on
Vitamin D Metabolism and Adipose Tissue Inflammation
in High-Fat Diet-Induced Obese Mice**

2019년 2월

서울대학교 대학원

식품영양학과

박 찬 윤

고지방식으로 유도한 비만마우스에서
비타민 D 섭취 수준이
비타민 D 대사와 지방조직 염증반응에
미치는 영향

Effects of Vitamin D Supplementation on
Vitamin D Metabolism and Adipose Tissue Inflammation
in High-Fat Diet-Induced Obese Mice

지도 교수 한 성 립
이 논문을 생활과학박사 학위논문으로 제출함
2018 년 10 월

서울대학교 대학원
식품영양학과
박 찬 윤

박찬윤의 생활과학박사 학위논문을 인준함
2018 년 12 월

위 원 장 _____ (인)

부위원장 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

위 원 _____ (인)

국 문 초 록

고지방식으로 유도한 비만마우스에서 비타민 D 섭취 수준이 비타민 D 대사와 지방조직 염증반응에 미치는 영향

서울대학교 대학원
식품영양학과
박 찬 윤

비만은 지방조직에서 염증반응을 야기하여 대사성 질환을 초래하기도 하며, 영양소의 체내 대사에 영향을 미치기도 한다. 체내 칼슘과 인의 항상성유지에 중요한 역할을 하는 비타민 D는 비만인 사람에서 혈중 농도가 낮다고 보고되었다. 지용성인 비타민 D가 지방조직에 저장되는 것이 밝혀지면서 비만인 경우에 증가된 지방조직에 체내의 비타민 D가 이동하여 혈액의 25(OH)D 농도가 낮아진다는 가설이 제기되었다. 하지만 조직에서 비타민 D를 측정하는 것이 까다롭고, 피부에서 합성되는 비타민 D를 통제하기 어려워서 이를 직접적으로 증명한 연구는 부족한 실정이다. 비만은 또한 신장에서의 1,25(OH)₂D 형성 기전과 그 외 조직에서 국소적으로 생성되는 1,25(OH)₂D의 작용에 영향을 미친다. 특히 지방조직을 구성하는 지방세포와 면역세포에는 CYP27B1과 VDR이 존재하는데, 다수의 세포 실험에서 1,25(OH)₂D가 VDR과 결합하여 면역세포의 염증성 사이토카인 생성에 관여하는 것이 확인되었다. 하지만 대부분의 선행연구는 세포주를 이용한 *in vitro* 실험이므로, 실제 비타민 D 섭취가 지방조직의 염증 반응에 미치는 영향을 확인한 연구가 거의 없다. 본 연구에서는

비타민 D의 섭취 수준을 달리하였을 때 고지방식으로 유도된 비만이 체내의 비타민 D 대사와 저장에 미치는 영향과 체내의 1,25(OH)₂D 대사에 미치는 영향을 알아보았다. 또한 비타민 D 섭취가 비만마우스의 지방조직 내 염증반응에 미치는 영향을 확인하고, 비만마우스의 지방조직을 구성하는 지방세포와 stromal vascular cell (SVC) 각각에 *in vitro* 1,25(OH)₂D를 처리하여 각 세포에서 염증성 사이토카인이 생성되는 기전에 비타민 D가 미치는 영향을 알아보고자 하였다.

연구 1에서는 6주령 C57BL/6 마우스에게 비타민 D₃의 양 (LVd: 50 IU, CVd: 1,000 IU, HVd: 25,000 IU 비타민 D₃ /kg diet)을 달리한 대조식이(CON: 10% kcal fat) 혹은 고지방식이(HFD: 45% kcal fat)를 13주간 공급하였다. 체중, 간 지질량, 혈중 25(OH)D 농도, 간과 지방조직의 비타민 D₃와 25(OH)D₃ 수준, 소장, 간, 지방조직에서 비타민 D의 흡수와 관련된 유전자 mRNA 수준, 간 조직에서 25-hydroxylase mRNA 수준을 측정하였다. 간과 지방조직에 있는 비타민 D₃ 및 25(OH)D₃의 수준은 추출방법의 유효성을 검증한 뒤 LC-MS/MS 로 측정하였다. 고지방식이가 25(OH)D 농도에 미치는 영향은 식이의 비타민 D₃ 함량에 따라 달랐다. 비타민 D₃를 보충 섭취한 HVd군에서는 HFD군의 혈청 25(OH)D 농도가 CON군에 비해 유의적으로 낮았으며 간과 지방조직에 저장된 비타민 D₃의 함량은 HFD군이 CON군에 비해 유의적으로 높았다. 따라서 비타민 D를 보충하였을 때 HFD군의 조직에 저장된 비타민 D₃의 총량(ng)이 증가하여 혈청 25(OH)D가 상대적으로 낮아졌을 가능성이 있다. 비타민 D 섭취가 부족한 LVd군에서는 HFD군의 혈청 25(OH)D 수준이 CON군에 비해 높은 경향성을 보였는데, 전반적으로 HFD군에서 소장 상부의 비타민 D 흡수 관련 지표인 *Mttp*와 *Abcal1*의 mRNA 수준이 CON군에 비해 높았으며, *Cd36*의 발현은 높은 경향성을 보였다.

연구 2에서는 6주령 C57BL/6 마우스를 고지방식이 유무(10%, CON 혹은 45% kcal fat, HFD)와 비타민 D₃ 보충 여부(1,000 IU, CVd 혹은

25,000 IU vitamin D3/kg diet, HVd)로 나누어 13주간 실험식을 공급하였다. 체중, 혈액과 지방조직의 25(OH)D 수준, 혈액의 1,25(OH)2D 및 PTH 농도를 측정하였다. 신장과 지방조직에서 비타민 D hydroxylase의 mRNA 수준과 지방조직에서 염증성 케모카인 및 사이토카인의 mRNA 수준을 측정하였다. 전반적으로 비타민 D3의 보충섭취 시 혈중 1,25(OH)2D의 농도가 높았다. CVd군의 경우, 고지방식이 섭취 시 1,25(OH)2D 및 PTH 농도가 높은 것이 관찰되었으나, 비타민 D3를 보충한 HVd군의 경우, CVd군과 달리, 고지방식이 섭취에 따른 1,25(OH)2D와 PTH 농도 차이가 없었으며, 신장의 *Cyp27b1* mRNA 수준도 HFD_HVd군과 CON_HVd군 사이에 유의적인 차이를 보이지 않았다. 신장의 *Cyp24a1* mRNA 수준은 대조식이군(CON)의 경우, CON_HVd군이 CON_CVd군에 비해 높은 수준이었으나, HFD군에서는 HFD_HVd군과 HFD_CVd군 사이에 유의적인 값의 차이가 없었다. 부고환 지방조직에서 염증과 관계된 유전자를 측정한 결과, *Mcp-1*과 *Rantes* mRNA 수준은 전반적으로 HFD군에서 높았고 비타민 D를 보충한 군에서 낮았다. *Il-6*와 *Il-1β*도 전반적으로 HVd군에서 낮은 mRNA 수준을 보였다. 지방조직에서 *Cyp27b1* 및 *Vdr*의 발현이 확인되었으므로 지방조직에서 국소적으로 1,25(OH)2D가 생성되어 염증 완화 기전에 관여하였을 것으로 사료된다.

연구 3에서는 먼저 5주령의 C57BL/6 마우스에게 비타민 D3의 양을 달리한(1,000 혹은 10,000 IU 비타민 D3/ kg diet, DC 혹은 DS) 대조식이 혹은 고지방식이(10% 혹은 45% kcal fat, CON 혹은 HFD)를 13주간 공급하였다. 지방조직에서 SVC를 분리한 뒤, FACS 분석을 통해 대식세포, NK 세포, T 세포, B 세포의 비율을 확인하였다. 별도의 5주령 C57BL/6 마우스에 대조식이 혹은 고지방식이(10% 혹은 60% kcal fat, CON 혹은 HFD)를 12주간 급여하였다. 지방조직을 SVC와 지방세포로 분리한 뒤 10 nM의 1,25(OH)2D3로 처리하여 총 48시간 배양하였는데, 배양 중 회수 24시간 전에 LPS (100 ng/mL)로 자극하고 이후 상층액과 세포를 회수하였다. 상층액에서 염증성 사이토카인의 단백질 농도를

측정하고, SVC에서는 염증 기전과 관련된 유전자의 mRNA 수준을 측정하였다. FACS 분석 결과, 지방조직 내 SVC, 대식세포, NK 세포, 그리고 T 세포의 수가 CON군에 비해 HFD군의 지방조직에서 유의적으로 많았다. 하지만 비타민 D 보충에 의한 면역세포 수의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다. CON군과 HFD군으로부터 분리한 세포에서 분비된 염증성 사이토카인을 측정한 결과, 전반적으로 HFD군의 SVC와 지방세포의 IL-6와 MCP-1의 분비가 CON군에 비해 유의적으로 높았다. *In vitro* 1,25(OH)₂D₃ 처리 시, HFD군의 SVC에서는 IL-6, MCP-1, IL-1 β 의 분비가 낮아졌으며, CON군의 SVC에서는 IL-6 분비가 유의적으로 감소하였다. SVC에서 측정한 *Tlr2* mRNA 수준은 CON군에 비해 HFD군의 값이 높았는데, 이는 모두 *in vitro* 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 유의적으로 낮아졌다. SVC *Dusp1* mRNA 수준은 *in vitro* 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 높아졌다.

본 연구결과를 통해 비타민 D₃를 충분히 보충하였을 때 대조마우스에 비해 비만마우스의 간과 지방조직에 비타민 D₃가 높은 수준으로 저장되는 것을 확인하였으며, 비만마우스의 혈중 25(OH)D 농도가 상대적으로 낮은 것을 확인하였다. 또한 비타민 D₃ 보충 섭취 시, 비타민 D₃를 보충하지 않았을 때 관찰되었던 비만에 의한 혈중 PTH와 1,25(OH)₂D의 상승은 보이지 않았지만, 신장의 *Cyp24a1* 수준은 비타민 D₃를 보충하였을 때 비만에 의해 저하되었으므로 비타민 D₃ 보충 시에도 비만에 의해 일부의 비타민 D 대사 변화가 나타남을 확인하였다. 더 나아가 보충 섭취한 비타민 D₃가 체내에서 1,25(OH)₂D로 활성화되어 지방조직의 염증반응을 완화시킴을 확인하였으며, 비타민 D₃ 보충이 비만으로 야기된 지방조직 내로의 면역세포 침윤을 완화하지는 않지만, 비타민 D가 지방조직 내 SVC에서 *Tlr2*와 *Dusp1*을 조절하여 염증성 사이토카인의 분비를 감소시키는 것을 확인할 수 있었다.

주 요 어: 비만, 비타민 D 보충, 지방조직, 비타민 D 농도, 1,25(OH)₂D

대사, 염증 반응

학 번: 2014-30124

목 차

국 문 초 록.....	i
목 차.....	v
표 목 차.....	ix
그 립 목 차.....	xi
약 어 목 록.....	xiii

제 1 장 서 론	1
-----------------	---

제 2 장 문 헌 고 찰	6
2. 1. 비타민 D의 대사와 기능.....	6
2.1.1. 비타민 D의 구조와 급원	6
2.1.2. 식이로 섭취한 비타민 D의 흡수 기전 및 체내 대사.....	8
2.1.3. 비타민 D의 조직분포	13
2.1.4. 비타민 D의 기능.....	18
2. 2. 비만과 비타민 D의 관련성	22
2.2.1. 비만으로 인한 혈중 25(OH)D의 변화.....	22
2.2.2. 비만에서 혈중 25(OH)D의 변화기전.....	23
2.2.3. 비만으로 인한 1,25(OH) ₂ D의 대사이상	25
2. 3. 지방조직에서 활성형 비타민 1,25(OH) ₂ D의 역할.....	26
2.3.1. 지방조직의 구조와 세포	26
2.3.2. 비만으로 인한 지방조직의 변화.....	28
2.3.3. 지방조직에서 1,25(OH) ₂ D가 염증반응에 미치는 영향.....	32

제 3 장 비만이 비타민 D의 흡수와 조직 내 함량에 미치는 영향37

3. 1. 서론.....	37
3. 2. 연구 방법	40
3.2.1. 실험 동물 및 식이.....	40
3.2.2. 신체조성 측정	43
3.2.3. 희생 및 시료 수집.....	43
3.2.4. 간의 중성지방 수준 측정	43
3.2.5. 혈청 25(OH)D 농도 측정.....	44
3.2.6. 간과 지방조직에서 비타민 D ₃ 와 25(OH)D ₃ 추출.....	45
3.2.7. 조직 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR 분석.....	51
3.2.8. 통계 분석방법	54
3. 3. 연구 결과	55
3.3.1. 체중, 체지방량, 간 무게 및 간의 중성지방 수준	55
3.3.2. 혈청 25(OH)D 농도	57
3.3.3. 소장에서 비타민 D의 흡수 관련 지표의 발현량	59
3.3.4. 소장을 통해 흡수된 비타민 D의 이동과 관련된 유전자의 발현량.....	62
3.3.5. 간과 지방조직에서의 비타민 D ₃ 와 25(OH)D ₃ 농도 및 함량	64
3.3.6. 간과 지방조직의 25-hydroxylase 발현량	74
3. 4. 고찰.....	76

제 4 장 비만마우스에서 비타민 D 보충이 1,25(OH)₂D의 대사 및 지방조직의 염증지표에 미치는 영향 84

4. 1. 서론.....	84
4. 2. 연구 방법	87
4.2.1. 실험 동물 사육	87
4.2.2. 희생 및 시료 수집.....	89

4.2.3. 혈청 1, 25(OH) ₂ D 농도 측정	89
4.2.4. 혈청 PTH 농도 측정	90
4.2.5. 조직 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR 분석	90
4.2.6. 통계 분석방법	93
4. 3. 연구 결과	94
4.3.1. 체중, 조직 무게 및 혈청과 지방조직의 25(OH)D 농도	94
4.3.2. 혈청 1, 25(OH) ₂ D 농도	96
4.3.3. 혈청 PTH 농도	98
4.3.4. 신장의 1-hydroxylase 및 24-hydroxylase, megalin 발현량 ...	100
4.3.5. 지방조직의 <i>Cyp27b1</i> 및 <i>Vdr</i> 발현량	102
4.3.3 지방조직의 케모카인 발현량	104
4.3.3 지방조직의 사이토카인 발현량	106
4. 4. 고찰	108

제 5 장 비만마우스의 지방조직 내 지방조직유래혈관세포(SVC)와 지방세포의 염증반응에 1,25(OH)₂D₃가 미치는 영향114

5. 1. 서론	114
5. 2. 연구 방법	117
5.2.1. 실험 동물 및 식이	117
5.2.2. 희생 및 시료 수집	121
5.2.3. 지방조직 내 면역세포의 유세포 분석	121
5.2.4. 배지 및 1,25(OH) ₂ D ₃ 용액의 준비	124
5.2.5. 지방조직에서 지방세포와 SVC 분리 및 배양	124
5.2.6. 세포 배양액에서 MCP-1 단백질 농도 측정	127
5.2.7. 세포 배양액에서 IL-6, IL-1 β , TNF- α 단백질 농도 측정	127
5.2.8. SVC에서 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR 분석 ...	128
5.2.9. 통계 분석방법	129
5. 3. 연구 결과	131

5.3.1. 체중, 체지방량 변화 및 혈액 지표.....	131
5.3.2. 지방조직의 SVC중 면역세포의 분포.....	133
5.3.3. 체중, 체지방량 변화 및 혈액 지표.....	138
5.3.4. SVC 배양액의 염증성 사이토카인 농도.....	140
5.3.5. 지방세포 배양액의 염증성 사이토카인 농도.....	143
5.3.6. SVC에서의 염증관련 유전자의 발현량	146
5. 4. 고찰.....	148
제 6 장 결론 및 제언.....	154
 참 고 문 헌.....	 160
Abstract	178

표 목 차

Table 2-1. ^{14}C content and Vitamin D distribution in tissues and organs ...	16
Table 2-2. Vitamin D content in tissues	17
Table 2-3. Function and distribution of pro-inflammatory cytokines	31
Table 2-4. 1,25(OH) $_2$ D $_3$ and inflammation	35
Table 3-1. Composition of the experimental diets	42
Table 3-2. LC-MS/MS solvent gradients for vitamin D $_3$ and 25(OH)D $_3$	49
Table 3-3. LC-MS/MS conditions for vitamin D analysis	50
Table 3-4. Primer sequences used in real-time PCR	53
Table 3-5. Body weight, weight gain, body fat, and dietary intake of mice in the CON and HFD groups fed different levels of vitamin D.....	56
Table 3-6. MRM transition and collision energies (CE).....	65
Table 3-7. Accuracy of vitamin D $_3$ and 25(OH)D $_3$ measurements in adipose tissue and liver.	67
Table 3-8. Within day (n=3) and between day (n=3) precision of vitamin D $_3$ and 25(OH)D $_3$ measurements from adipose tissue and liver.....	68
Table 3-9. Vitamin D $_3$ levels and amount in liver and epididymal fat tissue	70
Table 3-10. 25-hydroxyvitamin D $_3$ levels and amount in liver and epididymal fat tissue	72
Table 4-1. Composition of the experimental diets	88
Table 4-2. Primer sequences used in real-time PCR	92
Table 4-3. Body weight, weight gain, body fat, and dietary intake of mice in the CON and HFD groups fed different levels of vitamin D.....	95
Table 5-1. Composition of the experimental diets (1).....	119
Table 5-2. Composition of the experimental diets (2).....	120
Table 5-3. Cell surface markers for murine immune cells in adipose tissue	123
Table 5-4. Primer sequences used in real-time PCR	130
Table 5-5. Body weight, weight gain, body fat, and dietary intake of mice in the CON_DC, CON_DS, HFD_DC and HFD_DS groups	132

Table 5-6. Weights of visceral fat tissue and total cell numbers of (A) Stromal vascular cell (B) CD45 positive cell (C) Macrophage (D) NK cell (E) B cell (F) CD4 T cell (G) CD8 T cell in visceral adipose tissue	136
Table 5-7. Body weight, weight gain, body fat, and dietary intake of mice in the CON and HFD groups	139

그림 목 차

Figure 1. Study outline: objective of each study.....	5
Figure 2-1. Structure of vitamin D and vitamin D metabolism pathway	7
Figure 2-2. Proteins involved in vitamin D transport across the enterocyte	12
Figure 2-3. A summary model for rapid, plasma membrane-initiated vitamin D signaling	21
Figure 2-4. Inflammatory changes in adipose tissue and pancreatic islets associated with obesity	30
Figure 2-5. Molecular actions of 1,25(OH) ₂ D ₃ in inflammation and energy homeostasis in adipocytes	36
Figure 3-1. Solid phase extraction process of vitamin D and its metabolite.	47
Figure 3-2. Serum 25(OH)D levels (ng/ mL)	58
Figure 3-3. The mRNA levels of genes involved in vitamin D absorption in jejunum.....	60
Figure 3-4. The mRNA levels of <i>Mttp</i> in jejunum.....	61
Figure 3-5. The mRNA levels of genes involved in vitamin D transport in A) epididymal adipose tissue and B) liver	63
Figure 3-6. Chromatographic separation for each mass transition.....	66
Figure 3-7. Correlation between liver 25(OH)D ₃ levels and serum 25(OH)D levels	73
Figure 3-8. The mRNA levels of 25-hydroxylases in (A)liver and (B)epididymal fat tissue.....	75
Figure 4-1. Serum 1, 25(OH) ₂ D levels (pg/ mL).....	97
Figure 4-2. Serum PTH levels (pg/ mL).....	99
Figure 4-3. The mRNA levels of genes involved in vitamin D metabolism in kidney	101
Figure 4-4. The mRNA levels of <i>Cyp27b1</i> and <i>Vdr</i> in kidney	103
Figure 4-5. The mRNA levels of chemokines in epididymal adipose tissue	105
Figure 4-6. The mRNA levels of cytokines in epididymal adipose tissue	107
Figure 5-1. The experimental design and cell culture process	126

Figure 5-2. Cell numbers per gram of visceral adipose tissue. (A) Stromal vascular cells (B) CD45 positive cells (C) Macrophage (D) NK cells (E) B cells (F) CD4 T cells (G) CD8 T cells	134, 135
Figure 5-3 Flow cytometric dot plots of macrophage from visceral adipose tissue	137
Figure 5-4. MCP-1 and IL-6 production levels (ng/mL) in Stromal vascular cells from CON and HFD mice	141
Figure 5-5. IL-1β and TNF-α production levels (pg/mL) in Stromal vascular cells from CON and HFD mice	142
Figure 5-6. MCP-1 and IL-6 production levels (pg/ μg DNA) in adipocytes from CON and HFD mice	144
Figure 5-7. IL-1β and TNF-α production levels (pg/ μg DNA) in adipocytes from CON and HFD mice	145
Figure 5-8. The mRNA levels of genes involved in inflammation in SVCs.	147

약 어 목 록

1,25(OH)₂D, 1,25-dihydroxyvitamin D
25(OH)D, 25-hydroxyvitamin D,
ACN, acetonitrile
BSA, bovine serum albumin
CD36, cluster determinant36
CON, control diet
CVd, control vitamin D diet
DC, vitamin D control
DEPC, diethyl pyrocarbonate
DEXA, dual energy X-ray absorptiometry
DMEM, Dulbecco's modified eagle's media
DS, vitamin D supplement
DW, distilled water
FACS, fluorescence-activated cell sorting
FBS, fetal bovine serum
GWAS, genome wide association study
HFD, high-fat diet
HVd, high vitamin D diet
KO, knock-out
LC-MS, liquid chromatograph-mass spectrometer
LOQ, limit of quantitation
LPS, lipopolysaccharide
LVd, low vitamin D diet
LSD, least significant difference
MAPK, mitogen activated protein kinase
MKP, mitogen activated protein kinase phosphatase
MRM, multiple reaction monitoring
MTBE, methyl tert-butyl ether
MTP, microsomal triglyceride transferase protein
NF-κB, nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NKT, natural killer T
NLR, nucleotide-binding oligomerization domain like receptors
NPC1L1, niemann-PickC1-like 1
PBMC, peripheral blood mononuclear cell
PBS, phosphate buffered saline
PTAD, 4-Phenyl-1,2,4-triazole-3,5-dione
RXR, retinoid X receptor
SPF, specific pathogen free
SR-B1, scavenger receptor Class B type1
SVC, stromal vascular cell
SVF, stromal vascular fraction
Th, helper T
T reg, regulatory T
TLRs, toll-like receptors
UVB, ultraviolet B
VDR, vitamin D receptor
VDRE, vitamin D response element
WAT, white adipose tissue

제 1장 서론

전세계적으로 혈중 비타민 D 부족 현상이 종종 보고되고 있다(Holick 2009, Yoshimura *et al.* 2013, Kim *et al.* 2014). 최근 비타민 D 부족이 무기질 대사이상을 야기할 뿐 아니라 당뇨, 지방간 등과 같은 대사성 질환을 유발할 수 있다는 가능성이 제시되면서 비타민 D 보충에 대한 관심이 증가하고 있다(Garcia *et al.* 2009, Mezza *et al.* 2012). 다양한 질환들의 위험요인으로 알려진 비만은 비타민 D 부족과도 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 비만인 사람에서 혈중 25(OH)D 농도가 낮고, BMI와 혈중 25(OH)D 사이에 음의 상관관계가 있다고 보고되었을 뿐 만 아니라, 이러한 비만에서의 비타민 D 부족이 염증반응을 야기한다고도 알려진 바 있다(Pereira-Santos *et al.* 2015). 더불어 혈중 1,25(OH)₂D 농도가 비만 마우스에서 상승하는 등 비만으로 인해 비타민 D의 대사 이상이 일어나는 것으로 나타났다(Park *et al.* 2015, Jung *et al.* 2018).

비만한 사람의 혈중 25(OH)D 농도 저하의 원인으로는 외부 활동 감소로 인한 피부에서의 비타민 D 합성 부족, 지방조직에의 비타민 D 격리, 또는 지방조직의 용적 증가에 따른 혈중 비타민 D의 희석 등이 제시되어 왔으나 실제로 정확한 기전은 아직까지 밝혀지지 않았다. Wortsman 등(2000)은 정상군과 비만군에게 동일한 양의 비타민 D를 섭취시키거나 UVB를 쬌여 피부에서 비타민 D를 합성하게 한 다음 측정된 혈중 25(OH)D가 상대적으로 비만군에서 낮음을 확인한 뒤 “지방조직 내 비타민 D 격리설”을 제안하였다. 이는 비타민 D를 보충하면 이것이 지방조직에 우선적으로 저장되어, 활성화된 비타민 D의 생리적인 이용능력이 저하되는 것을 근거로 제기되었다. Drincic 등(2012)은 비타민 D가 지방조직에 저장되어 혈중 25(OH)D가 저하되는 것에는 동의하지만, 비타민 D가 지방조직에 격리되는 것이 아니라, 단지 비타민 D는 혈액과 지방조직으로 분배되어 저장되는데 비만한 경우 지방조직의 부피가 증가하므로 총 비타민 D가 희석되어 혈액의

25(OH)D 농도가 감소된다는 “부피 증가에 따른 비타민 D 희석설”을 제안했다.

이러한 가설을 입증하기 위해서는 지방조직에서 비타민 D를 추출하여야 하는데, 지방조직에서 지용성의 비타민 D를 추출하는 것이 까다롭기 때문에(Blum *et al.* 2008, Lipkie *et al.* 2013), 비타민 D를 지방조직에서 측정한 선행연구가 적고, 비만인과 일반인의 지방조직 내 비타민 D 함량을 비교한 연구는 거의 없는 실정이다. Martinaityte 등(2017)은 3~5년간 비타민 D를 복용시키고 이후 1년간 비타민 D의 섭취를 제한한 다음 혈액과 지방조직의 비타민 D를 측정하였다. 그 결과 혈액의 25(OH)D 농도는 대조군에 비해 여전히 높았으며 지방조직의 비타민 D 농도는 서서히 감소하였는데, 이를 통해 보충한 비타민 D가 지방조직에 잠시 저장되었다가 서서히 혈액의 25(OH)D 농도에 영향을 미치는 것으로 간주하였다. Carrelli 등(2017)은 처음으로 비만 여성과 그렇지 않은 여성의 혈액 25(OH)D 농도와 지방조직의 비타민 D3를 측정하고 비교하였는데, 혈액의 25(OH)D와 비타민 D3의 농도는 군간에 차이가 없었다. 다만 체내 구성 비율을 고려한 결과 총 비타민 D3의 저장량은 비만군에서 더 높았다. 따라서 “부피 증가에 따른 비타민 D 희석설”을 지지하였으나, 특정집단의 비타민 D 보충제 섭취를 고려하지 않은 점과, 일부의 피험자에서만 조직 생검을 진행하였다는 한계점이 있었다.

또한 비만한 경우 혈중 1,25(OH)₂D 농도의 비정상적인 조절이 관찰되었는데, 비만인 경우에 혈액의 1,25(OH)₂D 농도가 높아진다고 보고되기도 하였고(Bell *et al.* 1985, Park *et al.* 2015) 낮아진다고 보고되기도 하였다(Camozzi *et al.* 2016). 혈액의 1,25(OH)₂D 수준은 반감기가 수시간 내로 짧아 빠르게 조절되는 지표임을 고려할 때 비타민 D의 섭취 여부와 섭취 정도가 중요할 것으로 사료되나, 비만에서 혈액의 1,25(OH)₂D가 높아진다고 보고된 연구에서는 비타민 D를 특별히 보충하지 않았으며, 1,25(OH)₂D가 낮아진다고 보고한 Camozzi 등(2016)의

연구에서는 일회적으로 다량의 비타민 D를 보충하였다. 따라서 비타민 D 섭취 정도와 비만의 상호작용이 혈액의 1,25(OH)₂D 대사에 미치는 영향에 대한 연구가 필요하다.

비만은 지방조직의 부피를 증가시키고 지방세포에서 분비되는 수많은 단백질들의 분비를 늘린다(Choe *et al.* 2016). 비만은 렙틴과 염증성 사이토카인, 케모카인들이 지방세포에서 분비되도록 하여 대식세포가 지방조직에 침윤되게 하며, 이는 더 많은 사이토카인의 생성을 유발하여 정도의 만성적인 염증반응을 야기한다. 대식세포 외에도 B 세포, T 세포, 그리고 NK 세포 등이 지방조직에 존재하며 이들은 지방조직의 염증 및 면역반응에 관여한다(Watanabe *et al.* 2013). 지방조직을 구성하는 지방세포와 대식세포에는 비타민 D 수용체와, 1-hydroxylase가 존재하는 것으로 밝혀졌는데, 이는 비타민 D가 단순히 지방조직에 축적되는 것이 아니라, 지방조직에서 대사되어 다른 유전자의 발현을 조절할 수 있음을 의미한다(Mutt *et al.* 2014). 실제로도 비타민 D는 지방조직의 지방생성과정(adipogenesis) 및 염증성 사이토카인 분비에 관여하는 것으로 보고된 바 있다(Mutt *et al.* 2014). 성숙한 3T3L1 세포에 1,25(OH)₂D를 처리한 경우 IL-6, TNF α 가 증가 혹은 감소한다고 보고되었으며, 비만 마우스에 1,25(OH)₂D를 섭취시키거나 사람의 지방조직에서 분리한 preadipocyte에 1,25(OH)₂D를 처리한 경우 염증성 사이토카인의 분비가 감소한다고 보고한 연구들도 다수 존재한다(Sun *et al.* 2008, Mutt *et al.* 2012, Gao *et al.* 2013, Karkeni *et al.* 2015). 상반된 연구결과가 존재하나, 최근의 연구들은 1,25(OH)₂D가 지방세포나 면역세포의 MAPK 혹은 NF- κ B 신호 전달체계를 억제하여 염증성 사이토카인의 분비를 감소시킨다고 보고하였다(Ding *et al.* 2013, vinh quoc Lu'o'ng *et al.* 2013). 하지만 세포주가 아닌 실제 비만한 상태의 지방조직에서 비타민 D의 효과를 확인한 연구가 적으며, 비만으로 인한 지방조직의 변화를 세포 별로 나누어 1,25(OH)₂D가 미치는 영향을 확인한 연구도 부족한 실정이다.

본 연구에서는 먼저 비만으로 인한 비타민 D 대사의 변화 기전을 파악하기 위하여, 비타민 D 섭취를 부족하게 하거나 보충한 뒤, 비만이 체내의 비타민 D의 대사에 미치는 영향을 알아보고 조직에 저장되는 비타민 D 수준을 확인하였다. 이를 위하여 마우스의 조직에서 비타민 D₃와 25(OH)D₃를 추출하는 방법을 확립한 뒤, 지방조직과 간 조직 내 함량을 측정하였다. 또한 비타민 D를 보충하였을 때 혈중 1,25(OH)₂D 대사에 비만이 미치는 영향을 확인하였다. 더 나아가서는 비타민 D 섭취가 비만으로 인한 지방조직에서의 염증반응에 미치는 영향을 확인하고 비만 마우스의 지방조직을 세포 별로 나누어 1,25(OH)₂D가 미치는 영향을 확인하였다.

본 연구는 지방조직 내 비타민 D를 추출하여 정량 하였으므로 비만에서 관찰되는 비타민 D 부족의 원인을 직접적으로 규명할 수 있다는 의의가 있다. 또한, 마우스에게 비타민 D 섭취 수준을 달리하였으므로 다양한 비타민 D 섭취상태에서 비만이 비타민 D 대사에 미치는 영향을 확인할 수 있다. 또한 비만에서 보고되는 지방조직의 염증반응기전에 비타민 D 섭취가 미치는 영향을 확인함으로써, 비만한 경우 비타민 D 보충 섭취가 필요한지에 대한 근거를 일부 제공할 수 있을 것으로 사료된다.

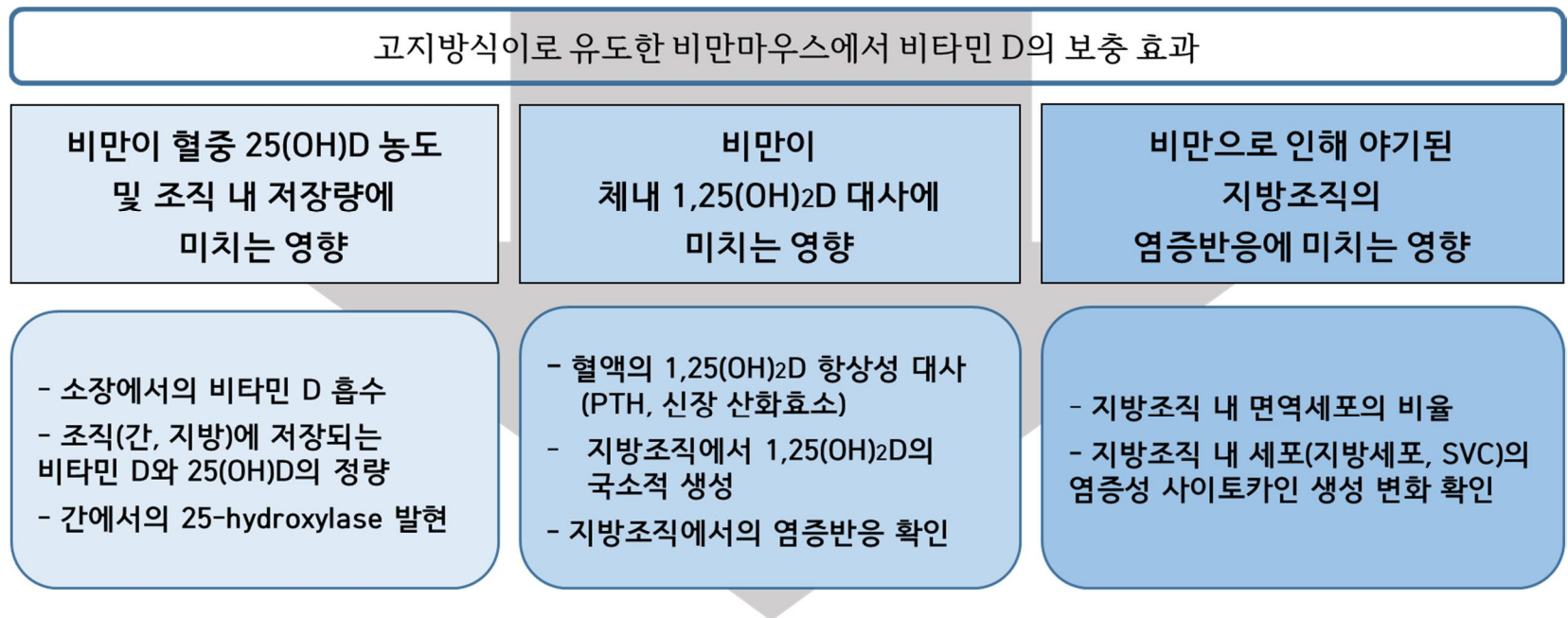


Figure 1. Study outline: objective of each study

제 2장 문 헌 고 찰

2.1. 비타민 D의 대사와 기능

2.1.1. 비타민 D의 구조와 급원

비타민 D는 세코스테롤 (seco-sterol) 구조를 기초로 삼는 지용성 비타민이며, 호르몬의 전구체 (prohormone)로 분류되기도 한다. 비타민 D는 결가지의 구조식에 따라 크게 비타민 D2와 D3로 나뉜다 (Figure 2-1). 비타민 D2 (ergocalciferol)는 비타민 D3와 달리 22번의 탄소에 이중결합을 가지며 추가적인 메틸기를 포함한다. 비타민 D2는 효모 혹은 식물에서 합성되거나 인위적으로 합성하여 식품에 추가된 상태로 얻는 반면, 비타민 D3(cholecalciferol)는 사람의 피부에서 햇빛을 통해 7-dehydrocholesterol로부터 합성되거나, 동물성 급원 식품을 섭취함으로써 얻는다.

피부에서 ultraviolet B(UVB)에 의해서 합성되는 비타민 D3는 UVB가 피부에 도달하는 정도와 피부에 존재하는 7-dehydrocholesterol의 이용가능성에 따라 결정된다(Del Valle *et al.* 2011). 계절, 피부의 색소, 고도, 자외선 차단제의 사용여부, 옷, 피부가 햇빛에 노출되는 시간, 나이 등이 피부에서 형성되는 비타민 D에 영향을 미친다. 피부로부터 합성되는 비타민 D는 독성을 야기하지 않는다. 비타민 D3를 함유한 대표적인 식품은 지방이 많은 생선, 생선유, 간유, 노른자 등이 있으며 일반 식품에 비타민 D를 강화시켜 섭취하기도 한다. 1920년대에 비타민 D의 부족이 구루병을 야기하는 것이 밝혀지면서 우유나 분유 등에 비타민 D를 추가적으로 첨가하여 섭취를 용이하도록 하였다. 비타민 D2와 D3 모두 체내에서의 대사나 호르몬의 전구체로의 기능에는 차이가 없으며, 모두 1 μ g의 비타민 D가 40 IU의 생물학적 활성을 갖는다. 비타민 D 결핍으로 야기된 구루병을 치료하는 기능도 동일하다고 보고된 바 있다(Jurutka *et al.* 2001).

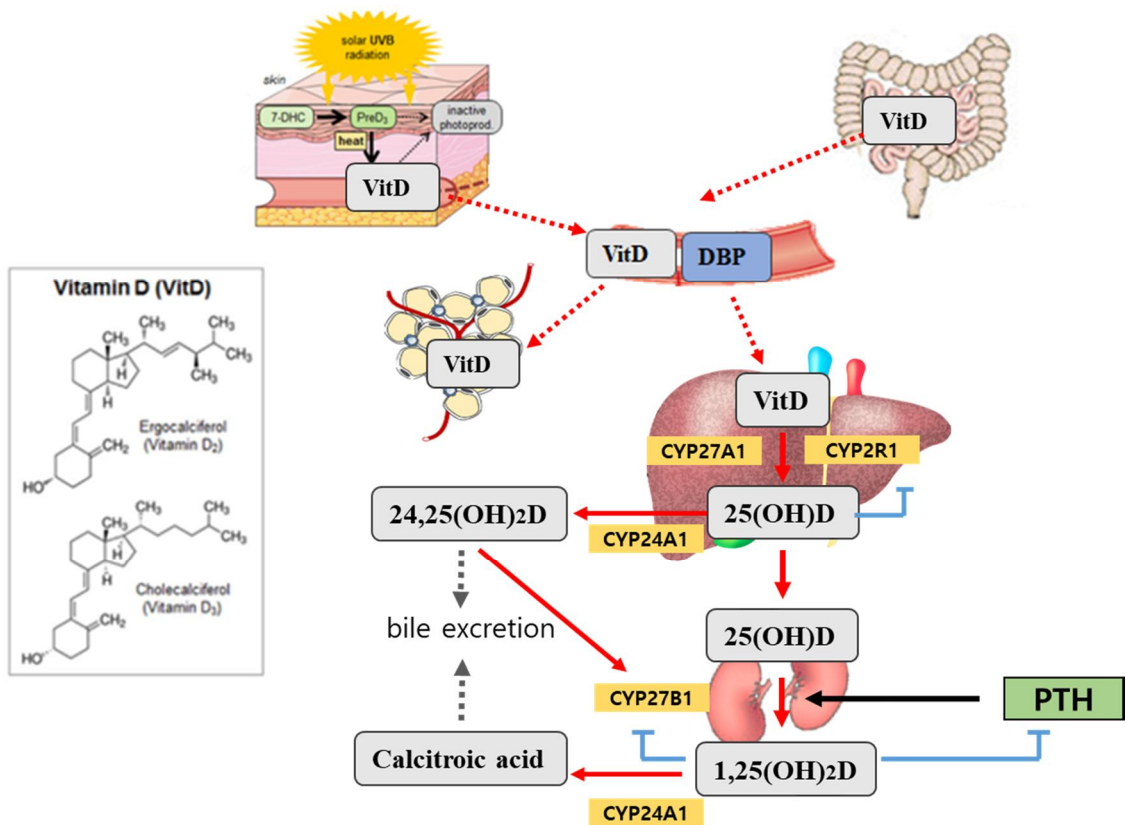


Figure 2-1. Structure of vitamin D and vitamin D metabolism pathway (Wintermeyer *et al.* 2016).

Vitamin D is supplied by cutaneous synthesis or diet intake. The bloodstream takes it into the liver, where its chemical structure is changed by hydroxylation. Then it is sent to the kidneys for another hydroxylation. Finally, the active metabolite 1,25(OH)₂D circulates through the body in order to be effective.

2.1.2. 식이로 섭취한 비타민 D의 흡수 기전 및 체내 대사

비타민 D는 지용성이기 때문에 식이로 섭취한 비타민 D는 식품 속 다른 식이 지방과 함께 소장에서 흡수된다(Haddad *et al.* 1993, Holick *et al.* 2003). 마취시키지 않은 랫트에 비타민 D를 소화관에 주입 (gut perfusion)하는 실험을 통해 비타민 D가 십이지장과 소장 상부에서 수동 확산 (passive diffusion) 되는 것이 확인되었으며(Hollander *et al.* 1978), 방사선 동위원소로 식별된 비타민 D를 섭취시키고 추적한 임상연구를 통해 비타민 D가 지방과 마찬가지로 대부분 림프관에서 발견되며 카일로마이크론과 함께 이동한다고 보고했다(Blomstrand *et al.* 1967, Compston *et al.* 1981).

과거의 선행연구들은 비타민 D를 지방과 함께 섭취할 경우 지방이 담즙산과 췌장의 리파아제의 분비를 촉진시키기 때문에 비타민 D가 더 효율적으로 흡수된다고 보고하였다(Hollander *et al.* 1978, Weber 1981). 최근의 임상연구들도 지방을 함유한 식품과 함께 비타민 D를 섭취하는 것이 혈중 25(OH)D를 더 높인다고 보고하였다(Mulligan *et al.* 2010, Dawson-Hughes *et al.* 2013). 하지만 지방의 섭취와 비타민 D의 흡수 사이에 관련이 없다고 보고한 연구도 있고(Tangpricha *et al.* 2003), 지방의 섭취량이 많을수록 비타민 D의 흡수가 증가하는 것은 아니기 때문에(Dawson-Hughes *et al.* 2013) 비타민 D 흡수에 필요한 적절한 지방의 양에 대해서는 더 연구가 필요하다.

최근 비타민 D가 단순히 소장으로 수동확산되어 흡수될 뿐 아니라 콜레스테롤 수송단백질을 통해서도 소장 내로 흡수되는 것으로 알려졌다(Reboul *et al.* 2011). 소장세포에 있는 콜레스테롤 수송 단백질인 Scavenger receptor Class B type1(SR-B1), Niemann-PickC1-like 1(NPC1L1), Cluster determinant36(CD36)을 통해 비타민 D가 세포 안으로 들어오고 세포 안에서 카일로마이크론을 형성하여 체내로 흡수된다는 것이다(Reboul 2015) (**Figure 2-2**). SR-B1은 80 kDa의 크기를 갖는 단일 사슬 막통과 당단백질로써, 십이지장에서 결장에 이르기까지 소장 미세

융모막(*brush border membrane*)에 분포되어 있다(Lobo *et al.* 2001). 초기에는 지질단백질의 수용체로 알려졌으나, 이후 SR-B1이 HDL에서 에스터화된 콜레스테롤의 일부를 선택적으로 소장 세포내로 이동시키는 것이 밝혀졌다(Krieger 1999). 그 외에도 유리 콜레스테롤, 인지질, 중성지방 산화물 등을 유입시키는 것으로 알려졌다(Hauser *et al.* 1998). Caco-2 세포와 HEK 세포에 SR-B1을 이식한 경우, 그리고 SR-B1을 과발현시킨 마우스의 경우 소장세포 내로의 비타민 D 유입이 증가된다는 것이 밝혀진바 있다. 하지만 SR-B1은 소장세포 내로 비타민 D가 유입되는 것 뿐만 아니라, 소장 미세 융모막 밖으로 비타민 D가 나가는 것에도 관여하는 것이 밝혀졌다(Reboul 2015). CD36은 십이지장과 공장의 소장 미세 융모막에서 발견되는 단백질로써, 지방산의 유입에 관여한다(Werder *et al.* 2001). CD36은 주로 긴사슬의 지방산이 소장으로 흡수되는 것을 도우며, 베타 카로틴을 소장세포 내로 유입시키는 것에도 관여한다. SR-B1과 마찬가지로 HEK 세포와 마우스의 배양절편에 CD36을 이식하는 실험을 통해 CD36이 비타민 D 흡수에도 관여하는 것이 알려졌다(Reboul 2015). NPC1L1은 간과 소장세포의 원형질막에서 관찰되는 135 kDa의 단백질로써, 세포 콜레스테롤에 의해 조절되는 세포 내 이입경로를 통해 원형질막과 세포막 사이를 순환하며 콜레스테롤과 *phytosterol*을 유입시키는 역할을 한다(Davis *et al.* 2004).

확산 혹은 단백질을 통해 소장으로 들어온 비타민 D는 소장 내부에서 콜레스테롤, 중성지방, 지방산, 인지질 등과 혼합되어 카일로마이크론을 형성하는데, 이 과정에서 비타민 D의 흡수율이 결정된다. 카일로마이크론의 형성에는 *microsomal triglyceride transferase protein* (MTP)가 필수적인데, 이는 지단백질에 결합하는 지질비율을 늘려서 부피를 팽창시키는 역할을 한다. MTP는 97 kDa의 heterodimeric 단백질로써 주로 소장세포와 간세포에서 발현되며, 소포체의 이중층에 존재하는 중성지방이 ApoB48 단백질로 이동하도록 돕고 그 외에도 콜레스테롤, 콜레스테롤 에스터, 그리고 인지질을 이동시킨다(Abumrad *et*

al. 2012). MTP를 저해할 경우 소장에서의 지방흡수가 저해되므로, 혈액의 지질 농도가 낮아진다고 보고된 바 있다(Hussain *et al.* 2011). 동위원소로 표지된 비타민 D 섭취를 통하여 확인한 건강한 성인의 비타민 D 흡수율은 55~99% 정도 (중간값 78%)이다(Thompson *et al.* 1966). 카일로마이크론은 지방조직이나 근육의 lipoprotein lipase(LPL)에 의해 대사되어 중성지방의 가수분해가 이루어지며, 이 과정에서 비타민 D가 조직에 들어가서 저장되기도 한다. 지방분해(lipolysis)과정 이후 생성된 카일로마이크론 램네프도 여전히 비타민 D를 일부 포함한다. 하지만 비타민 D를 포함한 지용성의 micronutrient가 소장세포에서 카일로마이크론을 형성하여 림프로 유입될 뿐 아니라, 소장의 기저부에 존재하는 ABCA1을 통과하여 림프로 흡수될 가능성이 제시되기도 하였다(Reboul *et al.* 2011).

이후 비타민 D는 간에서 25-hydroxylase인 CYP2R1, CYP27A1에 의하여 수산화과정을 거치며 25(OH)D로 전환된다. 이후 25(OH)D는 DBP와 결합하여 혈관을 순환하며, 신장에서 1-hydroxylase인 CYP27B1에 의하여 1,25(OH)₂D로 활성화된다(Tanaka *et al.* 1983). CYP27B1에 의한 신장에서의 수산화과정은 혈중 칼슘과 인의 수준에 따라 부갑상선 호르몬 (PTH)과 섬유화 세포 성장인자 (FGF23)에 의해 엄격하게 조절된다. PTH는 우선적으로 무기질의 항상성 유지를 위해 조절되기 때문에, 혈중 칼슘 수치가 낮거나, FGF23의 작용에 의해 인수치가 낮아진 경우 분비가 증가되며 이는 CYP27B1의 생성을 촉진한다. 반대로 PTH 분비가 억제되거나 FGF23이 증가하면 CYP27B1의 생성은 감소한다(Liu *et al.* 2007, Quarles 2008). 이외에도 비만이 PTH 분비를 증가시켜 CYP27B1의 발현을 높인다고 보고되기도 하였다(Parikh *et al.* 2004, Park *et al.* 2015). 신장의 1-hydroxylation을 통하여 활성화된 1,25(OH)₂D는 여러 조직으로 이동하여 조직에서 발현되는 VDR과 결합하여 비타민 D의 주요 기능들을 수행한다.

신장에는 또 다른 hydroxylase인 CYP24A1이 존재하는데 이는

25(OH)D 혹은 1,25(OH)₂D를 hydroxylation하여 24,25(OH)₂D 혹은 1,24,25(OH)₃D를 생성하여 비타민 D를 체외로 배출하는 과정에 기여한다. 비타민 D 최종 생성물은 담즙산에 포함되어 대변으로 배설되기도 하며, 일부는 소변을 통해 배설된다. 이 과정에서 신장에서 비타민 D의 재흡수가 일어나기도 한다(Del Valle *et al.* 2011).

혈액에 존재하는 비타민 D 대사체는 DBP와 결합하여 혈액을 이동한다. 비타민 D와 1,25(OH)₂D는 25(OH)D에 비해 DBP와 낮은 결합력을 갖는다. 비타민 D의 반감기는 2달, 25(OH)D의 반감기는 15일 정도, 1,25(OH)₂D의 반감기는 수시간인 것으로 알려졌다(Jones *et al.* 1998).

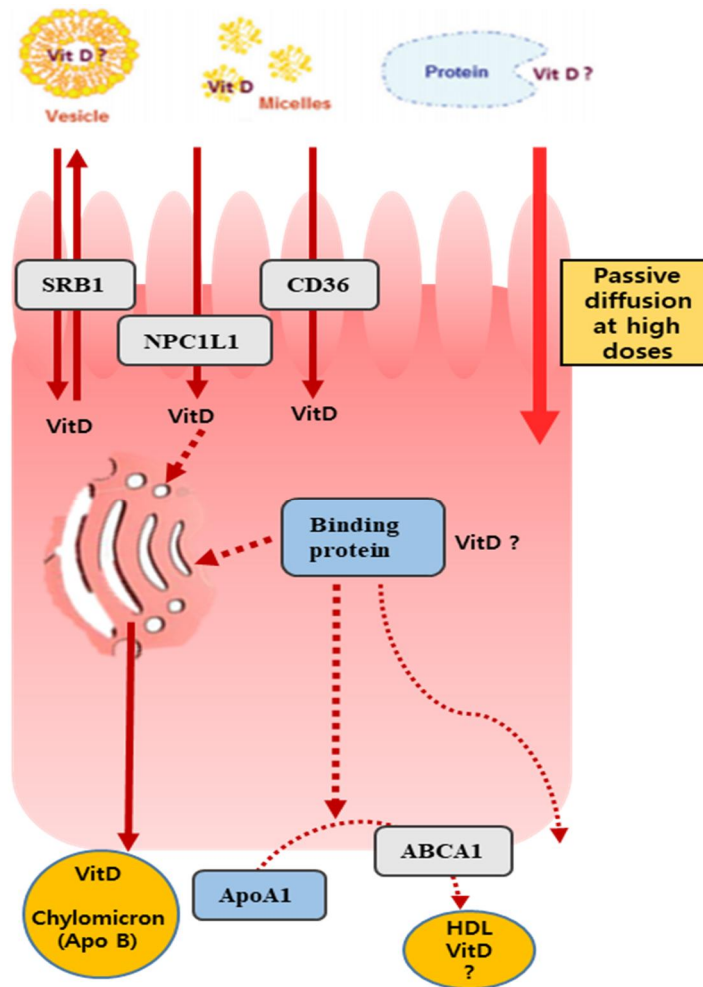


Figure 2-2. Proteins involved in vitamin D transport across the enterocyte (Reboul 2015).

Dashed line indicates unidentified pathway and ‘?’ indicates unidentified transporter. Vitamin D (Vit D) is taken up from mixed micelles, and maybe from vesicles and/or protein(s), by apical membrane transporters: SR-BI, CD36 and NPC1L1. A fraction of vitamin D likely enters the cell by passive diffusion. A part of vitamin D may then be effluxed back to the intestinal lumen via apical membrane transporters (at least SR-BI and possibly others). Another fraction is transported to the chylomicron incorporation site. Vitamin D in its free form is then secreted in the lymph into chylomicrons (apolipoprotein B-dependent route), although other secretion pathways such as a non-apolipoprotein B-dependent route via ABCA1 and HDL may exist.

2.1.3. 비타민 D의 조직분포

혈액의 25(OH)D는 반감기가 15일 정도로 긴 편이고, 섭취한 비타민 D의 양을 잘 반영하므로 체내 비타민 D의 상태는 혈중 25(OH)D의 농도로 평가되며, 혈액이 비타민 D의 1차적인 저장공간이라고 생각되기도 한다. 하지만 비타민 D는 소수성(hydrophobic)의 성질 때문에 지방조직에 비특이적으로 저장된다고 보고되어 왔으며 비만에서 관찰되는 혈중 25(OH)D의 저하의 원인도 지방조직에 비타민 D가 저장되기 때문이라고 알려진 바 있다. 하지만 비타민 D가 어떻게 지방조직으로 이동하는지 얼마나 저장되는지에 관하여는 명확하게 규명되지 않았으며 조직에서 비타민 D를 화학적으로 분석하는 것이 어렵기 때문에 조직의 비타민 D를 정량한 연구가 현재로서는 거의 없다.

초기의 연구는 조직에서 비타민 D를 추출하여 정량하기 보다는 방사성 동위원소가 표지된 비타민 D를 사람이나 동물에게 급여하고 조직 별로 방사선의 세기를 측정하였다(Rosenstreich *et al.* 1971, Mawer *et al.* 1972). Rosenstreich 등(1971)은 방사성 동위원소가 표지된 비타민 D를 랫트에 급여하고 조직 별로 방사선을 측정하였는데, 각 조직 별 방사능의 양과 조직의 무게 및 체내의 분포 비율은 **Table 2-1**과 같다. 논문에 근거하여 체내 분포를 계산하여 표에 제시하였다. 12일간 5 μ g의 비타민 D를 급여한 직후 농도가 가장 큰 조직은 신장이었고 그 다음으로는 지방조직, 혈액, 간의 순으로 방사능의 농도가 높았다. 12일간의 급여 이후 비타민 D를 식이에서 제외한 결과, 혈액, 간, 신장의 방사능이 3주 안에 거의 사라졌음에도 불구하고 지방의 방사능은 80일이 지나도 반 이하로 떨어지지 않았다. Mawer 등(1972)이 사람에게 동위원소가 표지된 비타민 D를 섭취시킨 결과 섭취 직후 가장 높은 방사능의 농도를 보인 조직은 간과 혈액이었으며 그 외에 소장, 신장, 뼈, 근육 등에서는 농도가 서서히 올라갔다. 지방조직의 농도가 가장 천천히 상승하였으며 섭취한지 일주일 후에도 농도가 거의 감소되지

않았다(Mawer *et al.* 1972). 또한 일주일 후에는 간, 혈액, 소장의 방사능 추출물은 산화된 극성의 형태를 띤 반면, 신장, 지방 그리고 근육의 추출물은 좀 더 무극성의 비타민 D에 가까웠다. 이러한 방사능 측정 연구를 통하여 지방조직이 산화되지 않은 비타민 D가 저장되는 주요 기관임이 확인되었다. 이러한 결과는 체내 비타민 D의 분포를 최초로 밝힌 연구이나, 각 조직에 존재하는 비타민 D의 형태를 정확히 알 수 없다는 제한점이 있다.

이후 Heaney 등(2009)은 pilot study와 과거 다른 선행연구에서 LC-MS 방법을 통해 측정한 조직 별 비타민 D와 25(OH)D의 농도 값을 보정한 뒤 합하여 하루에 2,000 IU의 비타민 D를 섭취하는 사람의 체내 비타민 D의 분포를 제시하였다. 검출된 비타민 D의 단위를 IU와 μg 로 나타내고, 그리고 체내의 비율로 표현하여 **Table 2-2**에 제시하였다. 돼지의 조직에서 측정한 비타민 D 농도를 보정하여 사람에서 측정한 비타민 D 농도와 통합하였으므로 결과값의 신뢰도는 높지 않다. 그럼에도 불구하고 이 연구를 통하여 섭취한 비타민 D의 양에 비해 체내에 존재하는 비타민 D가 다소 적다는 것을 확인하였다. 체내에 총 비타민 D(비타민 D와 25(OH)D를 합친 값)의 양이 7일동안 섭취한 비타민 D의 양보다 적었다. 또한 비타민 D가 지방조직에 주로 저장되지만 근육과 간에도 있다는 것을 확인하였다. 25(OH)D의 경우 지방, 근육, 혈액에 골고루 분포됨을 확인하였다. Heaney 등(2009)은 지방조직에 저장된 비타민 D의 양 자체가 적기 때문에 체중감소로 인한 혈중 25(OH)D의 상승은 기대하기 어렵다고 제안하였다. Piccolo 등(2013)도 LC-MS 법을 통해 비만인의 체중 감량 전후의 혈액과 지방조직의 25(OH)D 농도를 측정한 결과 유의적인 차이가 없음을 확인하였다. 따라서 체중 감소로 혈중 25(OH)D를 증가시키기 보다는 비타민 D를 섭취하거나, 피부에서 합성을 늘릴 것을 제안하였다.

그 외에도 Didriksen 등(2015)은 20명에게 매주 20,000 IU의 비타민 D를 3~5년간 복용시킨 후 혈액과 지방조직의 비타민 D₃와 25(OH)D를

측정하였다. 그 결과 비타민 D를 보충한 군의 평균 혈중 25(OH)D의 농도는 99 nmol/L, 지방조직의 비타민 D₃는 209 ng/g, 지방조직의 25(OH)D₃는 3.8 ng/g 이었으며, 비타민 D를 보충하지 않은 군의 평균 혈중 25(OH)D의 농도는 62 nmol/L, 지방조직의 비타민 D₃는 32 ng/g, 지방조직의 25(OH)D₃는 2.5 ng/g 로, 지방조직의 비타민 D₃ 농도에서 가장 큰 차이를 보였다. 뿐만 아니라 Malmberg 등(2014)은 time-of flight secondary ion mass spectrometry (TOF-SIMS)법을 이용하여 지방조직의 생검시료에서 비타민 D, 25(OH)D, 1,25(OH)₂D를 추출한 결과 비타민 D 및 그 대사체가 지방세포 내 지방소립(lipid droplet)에 존재하는 것을 확인하였다.

Table 2-1. ^{14}C content and Vitamin D distribution in tissues and organs^{1,2}(Rosenstreich *et al.* 1971)

Duration	Subcutaneous Fat			Blood ³			Kidney			Liver			Brain		
	Dpm/g	Wt. (g)	% dose	Dpm/g	Wt. (g)	% dose	Dpm/g	Wt. (g)	% dose	Dpm/g	Wt. (g)	% dose	Dpm/g	Wt. (g)	% dose
1	800	37.4	12.5	2,099	7.4	6.5	12,196	1.2	6.1	2,047	3.05	5.2	94	1.13	0.04
2	1,653	39	13.4	2,398	8.1	4.0	16,085	1.3	4.6	2,660	6.14	3.4	-	-	-
4	2,675	38.5	10.7	3,613	8.5	3.2	18,996	1.38	2.7	4,224	6.09	3.0	-	-	-
8	3,285	55.4	9.5	4,141	10.0	2.2	22,489	1.66	1.9	3,728	9.78	1.9	194	1.51	0.02
12	5,696	53.5	10.6	6,179	11.0	2.3	28,502	1.55	1.5	4,579	7.88	1.2	233	1.19	0.02

¹ All values are means of tissues from three animals, 21 day old Sprague-Dawley male rats fed semisynthetic diet devoid of vitamin D for 1 month and fed 5.0 μg (240, 000 dpm)/day of vitamin D3- ^{14}C dissolved in 0.1 mL corn oil for 12 days by direct instillation.

² % dose = {Dpm/g x tissue weight (g)} / {240,000 dpm x day} x 100

³ 6% body weight

Table 2-2. Vitamin D content in tissues^{1,2}(Heaney *et al.* 2009)

Tissue	IU			µg			% of distribution		
	Vit D	25(OH)D	Total	Vit D	25(OH)D	Total	Vit D	25(OH)D	Total
Fat	6,960	1,763	8,723	174.0	44.08	218.08	73.29	34.11	59.48
Muscle	1,527	1,055	2,582	38.18	26.38	64.55	16.08	20.41	17.61
Liver	168	214	382	4.20	5.35	9.55	1.77	4.14	2.60
Serum	271	1,559	1,830	6.78	38.98	45.75	2.85	30.16	12.48
Remainder	571	578	1,149	14.28	14.45	28.73	6.01	11.18	7.83
Total	9,497	5,169	14,666	237.43	129.23	366.65	100.00	100.00	100.00

¹ 4,000 IU vitamin D3= 100 µg of vitamin D

² % of distribution = specific tissue vitamin D amount (IU) / total vitamin D amount(vitamin D amount in fat, muscle, liver, serum and remainder) x 100

2.1.4. 비타민 D의 기능

비타민 D는 대부분 신장에 존재하는 1-hydroxylase인 CYP27B1 의해 수산화되어 활성화된 1,25(OH)₂D의 상태로 체내 여러 조직에 존재하는 비타민 D 수용체(VDR)과 결합하여 작용한다. 1,25(OH)₂D의 주된 기능은 혈중 칼슘과 인의 항상성을 유지시키며 뼈의 무기질화에 기여하는 것이나, VDR이 다양한 세포에서 발현되는 것으로 밝혀지면서, 세포의 분화, 면역반응 및 다른 유전자의 발현 조절에 영향을 미친다고 보고되었다. 더불어 1,25(OH)₂D는 세포의 핵에 존재하는 nVDR과 결합하여 유전자적 기전에 관여할 뿐 아니라 세포막의 mVDR과 결합한 뒤 칼슘 channel을 조절하여 비유전자적 기전에 관여한다(Revelli *et al.* 1998, Fleet 2004).

먼저 1,25(OH)₂D는 VDR과 결합한 뒤 Retinoid X receptor(RXR)과 heterodimer을 형성하여 vitamin D response element(VDRE)에 결합하여 다양한 coactivator와 결합한 뒤 다른 유전자의 전사를 조절한다. 대표적인 유전자는 소장에서 칼슘의 항상성을 조절하는 것과 관련된 TRPV6, osteocalcin, calbindin, 24-hydroxylase 등이 있다. 1,25(OH)₂D의 비유전자적 기능은 여러 신호 전달 경로의 활성을 통해 매개되는데, 주로 소장, 부갑상선, 간 등의 세포막의 수용체와 결합하여 세포의 칼슘 channel내로 칼슘이온이 증가하면서 2차 전달 체계를 통해 비교적 빠르게 신호를 전달한다(Revelli *et al.* 1998, Gropper *et al.* 2012). 1,25(OH)₂D는 G-단백질이나 Src kinase와 같은 nonreceptor tyrosine kinase와 상호작용하여 protein kinase A(PKA), PKC 그리고 mitogen activated protein kinase(MAPK)의 활성을 야기한다(Fleet 2004) (**Figure 2-3**).

1,25(OH)₂D는 세 가지 기전을 통하여 소장, 뼈, 신장 등에 작용하여, 혈중 칼슘의 농도를 정상 범위로 상승시키는 기능을 한다(Del Valle *et al.* 2011). 첫 번째 기전은 PTH와 관계없이 1,25(OH)₂D가 소장 전체에 작용하여 칼슘 흡수를 증가시키는 기전으로, 인의 흡수와는 독립적으로 칼슘의 흡수를 촉진한다. 두 번째 기전은 PTH가 1,25(OH)₂D의 농도를

상승시켜서 뼈에서 칼슘의 이동을 증진시켜 결과적으로 혈중 칼슘농도를 상승시키는 기전이다. 1,25(OH)₂D와 PTH는 성숙한 osteoblast의 receptor activator of NF-κB(RANK) ligand의 분비를 증가시킴으로써, osteoclast의 분화, 생성, 및 성숙을 증진시키는 것이다. 마지막 기전은 1,25(OH)₂D이 PTH와 함께 신장의 원위세뇨관을 자극하여 칼슘의 재흡수를 높이는 것이다.

1,25(OH)₂D의 수용체인 VDR은 T 세포, 대식세포, 단핵구와 같은 면역세포에서도 발현되며, 이는 1,25(OH)₂D가 면역반응에도 관여한다는 것을 의미한다(DeLuca 2004). 염기서열나열 연구를 통하여 1,25(OH)₂D가 체내의 전체 유전자 중 5%를 조절하는 것이 밝혀진 바 있다. 하지만 1,25(OH)₂D가 신장 외의 다른 세포나 조직에 생리학적으로 어떻게 작용하는지에 대해서는 명확하게 알려진 바가 없다. 특히 1,25(OH)₂D가 혈액에서 조직으로 분비되는 것인지 (paracrine), 아니면 그 전구체가 조직에서 CYP27B1에 의해 수산화되어 자가 분비되는 것인지 (autocrine)는 아직 밝혀지지 않았다. 만성 콩팥병 환자에게 1,25(OH)₂D의 농도가 저하된 것으로 보아, 신장이 비타민 D 1-hydroxylation의 주요 조직임은 분명하나, 신장 외에도 뇌, 태반, 정소, 소장, 지방조직, 림프구, 대식세포 등에서 CYP27B1의 단백질과 mRNA 발현이 확인되었다(Hewison *et al.* 2007). 이를 근거로 하여 1,25(OH)₂D와 면역반응의 연관성, 1,25(OH)₂D가 암 치료 및 예방에 미치는 영향에 대한 연구가 활발하게 진행 중이다.

1,25(OH)₂D가 면역반응에 미치는 영향은 명확하지 않으나, 내재 면역과 적응 면역 모두에 관여하는 것으로 보인다. 먼저 외부에서 1,25(OH)₂D를 주입하는 것은 고칼슘혈증이라는 부작용을 야기하는 반면 자가면역질환을 억제하는 것으로 알려져 있다(Deluca *et al.* 2001). 단핵구나 대식세포에는 혈중 25(OH)D가 세포 내로 유입되어 1,25(OH)₂D로 hydroxylation된 뒤 세포에서 작용하는 것으로 추측 되고 있으며, 생성된 1,25(OH)₂D가 항균성의 단백질인 cathelicidin의 분비를

증가시켜 세포매개성 면역을 증진시키는 것으로 보고되었다(Liu *et al.* 2006). 이는 CYP27B1을 발현하는 면역세포인 단핵구, 대식세포 등이 세포 표면의 TLR을 통해 결핵균과 같은 병원체의 침입을 인지하면, 1,25(OH)₂D가 VDR-RXR 복합체와 결합하여 defensin β 2나 cathelicidin antimicrobial peptide (hCAP18)의 전사를 직접적으로 촉진시키기 때문이다. 1,25(OH)₂D가 낮을 경우 감염으로 인한 치사율이 증가된다고도 보고되었다(Priehl *et al.* 2013).

1,25(OH)₂D가 내재면역을 증진시키는 것과는 달리 1,25(OH)₂D는 helper T (Th) 세포의 증식과 B 세포의 항체생성을 억제하는 것으로 연구되었으며 적응면역을 저해하는 것으로 보고되었다. 1,25(OH)₂D이 B 세포의 분화, 증식을 억제하며, 항체생성을 감소시키는데 이는 helper Th 세포를 통해 간접적으로 매개된다고도 보고되었다. 1,25(OH)₂D는 T 세포의 subtype에 따라 다른 영향을 미치는데, 전반적으로는 Th 세포의 증식과 분화 그리고 사이토카인의 생성을 억제한다고 보고되었다. 그 중에서도 염증성 사이토카인을 분비하는 Th1, Th9, Th22 세포는 억제한다고 알려진 반면 항염증성 사이토카인을 분비하는 Th2 세포는 촉진한다고 보고되었다(Priehl *et al.* 2013). IL-17을 생성하는 Th17세포의 활성화는 1,25(OH)₂D처리에 의해 억제된다고 보고된 반면 면역반응을 억제하여 자가면역질환을 저해하는 역할을 하는 regulatory T (Treg) 세포는 1,25(OH)₂D처리에 의해 증식이 촉진된다고 보고되었다(Penna *et al.* 2007).

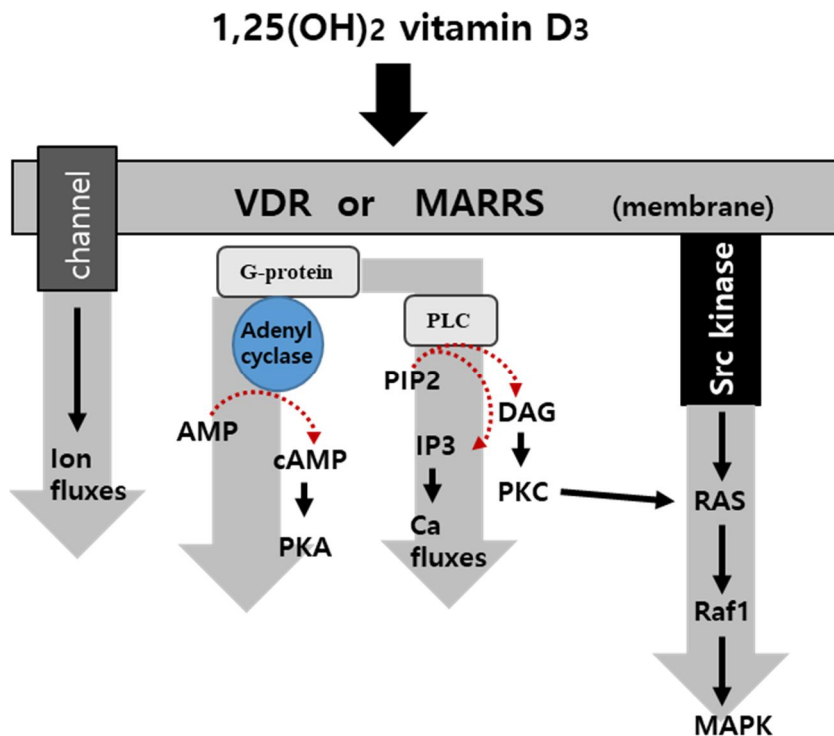


Figure 2-3. A summary model for rapid, plasma membrane-initiated vitamin D signaling(Fleet 2004).

1,25 dihydroxyvitamin D binds to either the VDR or the MARRS protein at the membrane surface and stimulates a variety of signaling pathways, presumably through direct interactions with G-proteins or nonreceptor tyrosine kinases like Src kinase. An interaction between ligand activated VDR and Src kinase has been partially characterized and may include the docking protein MNAR (enlargement at right). The downstream consequences of the membrane-initiated signaling include the opening of ion channels and the activation of PKA, PKC, and MAPK.

2.2. 비만과 비타민 D의 관련성

2.2.1. 비만으로 인한 혈중 25(OH)D의 변화

비만은 체내에 지방조직이 과다한 상태를 의미하며, 이는 당뇨병 및 고지혈증 등의 대사성 질환의 발병위험을 높이고 일부 암의 발생과도 연관이 있다고 알려졌다. 이렇듯 비만은 체내의 여러 영양소의 대사에 영향을 주는데, 최근 여러 대규모의 임상 연구를 통해 비만인 사람의 혈중 25(OH)D의 농도가 낮다고 보고된 바, 비만이 비타민 D 대사에도 영향을 주는 것이 드러났다.

Framingham heart study에 참여한 사람 중 심혈관계 질환이 있지만 당뇨병은 없는 1882명을 연구한 결과, 혈중 25(OH)D 농도는 계절, 허리둘레, 혈중 인슐린 양, 체내 지방량과 유의적인 상관관계가 있었으며, 혈중 25(OH)D 결핍 ($25(\text{OH})\text{D} \leq 50\text{nmol/L}$)의 비율은 체내 지방량이 높은 집단에서 낮은 집단에 비해 3배 더 높은 값을 보였다(Cheng *et al.* 2010). 전향 코호트 연구인 HUNT study에 참여한 2460명의 결과에 의하면, BMI가 30 이상이거나 허리둘레가 남성 $\geq 102\text{cm}$, 여성 $\geq 88\text{cm}$ 인 경우 혈중 25(OH)D 결핍의 비율이 더 높게 나타났다(Mai *et al.* 2012). 또한 23개의 게재된 논문을 메타분석한 연구에서도, 비타민 D의 결핍율이, BMI가 정상인 사람에 비해, 비만인 사람에게서 35%, 과체중인 사람에게서는 24% 더 높게 나타났다(Pereira-Santos *et al.* 2015). 이러한 현상의 원인을 규명하기 위해 여러 가설이 제시되었으나, 아직 어떤 기전으로 비만에서 혈중 비타민 D의 농도저하가 유발되는 것인지는 밝혀지지 않았다.

2.2.2 비만에서 혈중 25(OH)D의 변화기전

비만한 사람에게서 혈중 25(OH)D가 저하된 원인으로 여러 가지 기전이 제시되었는데, 그 중 대표적인 것들은 다음과 같다. 첫째로는 비만한 사람들이 외부활동을 적게 하여 햇빛을 통한 체내 비타민 D 합성이 감소하였다는 가설(Compston *et al.* 1981), 두 번째로는 비만한 경우 비타민 D 대사와 관계된 유전자들의 SNP 변이가 생겼을 가능성(Vimalleswaran *et al.* 2013), 세 번째로는 비만한 경우 증가한 1,25(OH)₂D가 피드백을 통하여 혈중 25(OH)D를 감소시켰을 가능성이 있다(Bell *et al.* 1984, Theodoropoulos *et al.* 2003). 마지막으로 가장 유력한 가설은 비타민 D가 비만한 사람의 증가된 조직, 특히 지방조직에 저장되어 혈중 25(OH)D가 낮아졌다는 것이다.

선행연구에 의하면 비타민 D가 지방조직에 저장되어 혈중 25(OH)D가 낮아졌다는 기전은 크게 지방조직의 비타민 D 격리설(sequestration)과 지방조직의 부피증가에 의한 비타민 D 희석기전(volumetric dilution)으로 나뉜다. 비타민 D 격리설은 Wortsman 등(2000)에 의해 처음으로 제시되었으며, 이는 비타민 D가 단순히 지방조직에 저장되는 것을 넘어서 비타민 D가 높은 비율로 지방조직에 격리되어, 적절한 비타민 D의 공급에도 불구하고 체내에서 저장된 비타민 D를 사용하는 것이 어려워지는 것을 의미한다. 이는 동일한 시간의 UVB를 쬘지거나, 같은 양의 비타민 D를 섭취하였을 때, 혈중 25(OH)D의 증가 정도가 비만한 사람에게서 낮다는 간접적인 결과를 근거로 하여 제시되었다. Drincic 등(2012)에 의해 제안된 비타민 D 희석기전은 체내로 유입된 비타민 D는 일정 비율로 혈액과 지방조직으로 분배되며, 체지방이 증가할 경우 체내의 비타민 D의 농도가 희석되어, 혈중 25(OH)D가 낮아질 수 있다는 설명이다. 부피와 농도 사이의 관계를 잘 보여주는 hyperbolic model을 이용하여 체중 혹은 체지방량과 혈중 25(OH)D 사이의 상관성을 입증하였다. 하지만 이 가설 역시 지방조직에서 직접적으로 비타민 D를 측정할 땐 제시된 것이

아니라 수식을 통해 간접적으로 제기된 것이다. 하지만 이후 비타민 D를 지방에서 직접 측정한 연구를 통해, 비타민 D가 지방조직에 격리되거나, 회석되는 방법 모두를 통해 지방조직에 저장 될 수 있다는 가능성이 제시되었다(Carrelli *et al.* 2017). Carrelli 등(2017)은 비만한 사람과 그렇지 않은 사람의 혈액과 지방조직의 비타민 D 농도에 차이가 없었으므로, 비만이 지방조직에 비타민 D를 높은 비율로 격리시키는 것은 아니지만, 지방조직 별 비타민 D 농도의 차이가 있었으므로, 지방조직에 동일하게 비타민 D가 저장되는 것은 아니라고 고찰하였다.

Genome wide association study(GWAS)를 통하여 비타민 D 대사와 관련된 유전자인 7-dehydrocholesterol reductase(DHCR7), CYP2R1 및 DBP의 변이가 혈중 25(OH)D의 농도를 낮추는 것으로 밝혀졌다(Wang *et al.* 2010). 이러한 유전자들의 변이가 비만 혹은 식이로 섭취한 지방의 양과 관계가 있을 것이라는 가설이 제시되어왔으나, 최근의 연구에 의하면 DHCR7 및 CYP2R1의 변이와 BMI사이에는 직접적인 관계가 없다고 알려졌으며 섭취한 지방의 양과도 유의적인 관계가 없다고 보고되었다(Vimaleswaran *et al.* 2013, Qi *et al.* 2015). 반면 유전적 변이로 인한 혈중 25(OH)D의 저하는 제2형 당뇨병과 연관성이 있다고 보고되기도 하였다(Afzal *et al.* 2014). 하지만 여러 연구 결과로 미루어 보아 비만한 사람의 혈중 25(OH)D 저하는 관련 유전자의 변이로부터 비롯되었다기 보다는 지방량의 증가로 인한 대사 변화에 기인한 것으로 사료된다.

2.2.3 비만으로 인한 1,25(OH)₂D의 대사이상

25(OH)D와 마찬가지로 비타민 D의 활성형인 1,25(OH)₂D의 농도도 비만의 영향을 받는 것으로 알려졌다. 혈중 25(OH)D에 비해 1,25(OH)₂D는 상대적으로 농도가 낮고, 반감기가 수시간으로 짧기 때문에 비타민 D의 영양상태를 나타내는 지표로 사용되지는 않는다. 하지만 비타민 D의 모든 기능이 1,25(OH)₂D의 형태로 작용하며, 1,25(OH)₂D가 철저하게 항상성이 조절되는 지표라는 점에서 비만이 1,25(OH)₂D 농도를 변화시키는 원인을 규명할 필요가 있다. 하지만 비만이 1,25(OH)₂D를 증가시키기도 하고(Bell *et al.* 1985, Park *et al.* 2015, Jung *et al.* 2018), 감소시키기도 하는(Konradsen *et al.* 2008, Camozzi *et al.* 2016) 상반된 연구 결과들이 존재한다.

Bell 등(1985)은 비만한 사람에게서 1,25(OH)₂D와 PTH의 농도가 비만하지 않은 사람에 비해 높은 것을 확인하였으며 비만이 PTH의 농도를 증가시켜 결과적으로 1,25(OH)₂D의 농도가 상승하였다고 설명하였다. Park 등(2015)과 Jung 등(2018)은 비만마우스의 혈중 1,25(OH)₂D 농도가 대조마우스의 값에 비해 높다고 보고하였으며, 이는 비만마우스에서 신장의 *Cyp27b1* mRNA 발현이 증가한 점 및 혈중 PTH의 농도가 상승한 것과 관련이 있다고 설명하였다. 반면 Konradsen 등(2008)은 1,25(OH)₂D와 BMI사이에 음의 상관관계를 관찰하였으며, 이는 비만에서 혈중 25(OH)D가 감소하였기 때문이라고 설명하였다.

2.3. 지방조직에서 활성형 비타민 1, 25(OH)₂D의 역할

2.3.1. 지방조직의 구조와 세포

과도한 열량을 섭취할 경우 여분의 에너지는 지질의 형태로 체내에 저장된다. 지질이 다른 영양소에 비해 더 많은 열량을 가지고 있기 때문이다. 지질은 체내 전반에 걸쳐 지방 세포의 형태로 지방조직에 저장되는데, 사람의 경우 피부 아래에 존재하는 피하지방과 내부의 장기를 싸고 있는 내장지방으로 나뉜다(Choe *et al.* 2016). 지방조직은 지방세포와 stromal vascular cell (면역세포, 상피세포, 줄기세포, 전구세포 등)으로 구성되어 있다.

지방은 단지 에너지를 저장하는 역할을 할 뿐만 아니라, 지방조직에서 렙틴이 분비된다는 것이 밝혀지면서 에너지 대사에 관여하는 내분비적 기관으로 분류되었다(Friedman *et al.* 1991, Zhang *et al.* 1994). 이후로 지방조직에서 분비되는 단백질들이 많이 발견되었으며 이들은 adipokine으로 명명되었다. 렙틴은 가장 잘 알려진 adipokine의 하나로, 식이 섭취 정도에 의해 분비되어 뇌의 신경 전달계를 조절하여 식욕을 억제하는 역할을 한다(Vaisse *et al.* 1996). 뿐만 아니라 렙틴은 지질 산화와 미토콘드리아의 biogenesis등에 관여한다(Minokoshi *et al.* 2002). 또 다른 adipokine인 adiponectin은 수용체와 결합하여 AMP-activated protein kinase를 자극시킴으로써 항비만 효과, 인슐린 저항성을 경감시키는 항당뇨 효과를 보인다(Scherer *et al.* 1995, Yamauchi *et al.* 2002).

비만으로 인한 지방조직의 증가는 지방세포가 커지는 hypertrophy, 지방 세포의 수가 많아지는 hyperplasia 그리고 두 가지 현상이 동시에 발생함으로 인한 것이다(Hirsch *et al.* 1969, Hirsch *et al.* 1970). 체내 지방이 증가하여 대사성 질환을 야기하는 것은 일차적으로 지방세포의 hypertrophy 때문이라고 보고되었다. 비대해진 지방세포는 괴저성의 지방세포를 많이 생성하는 경향이 있으며, 염증성 사이토카인의 분비를 증가시키는 모습을 보인다(Cinti *et al.* 2005, Jernas *et al.* 2006). 염증성

사이토카인의 분비는 다른 면역세포들이 지방조직 내로 모이는 것을 촉진하여 더 활발한 면역-염증반응이 일어나게 한다. 또한 hypertrophy는 국소적인 지방조직의 저산소증을 유발하기도 하고, 지방분해를 야기하여 유리지방산의 생성을 증가시킨다(Trayhurn 2013). 생성된 유리지방산은 간과 근육 등의 다른 조직에 축적되어 인슐린 저항증과 같은 이차적인 질환을 야기시킬 수 있다.

전구체 세포로부터 지방세포의 형성은 다양한 호르몬과 전사인자들을 통해 조절되는데, 대표적인 지방생성과 관련된 유전자는 Peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ)와 CCAAT enhancer binding protein families(C/EBPs)이다. Sterol regulatory element binding transcription factor 1c (SREBP1c)도 acetyl-CoA carboxylase (ACC), fatty acid synthase(FAS), 그리고 saturated fatty acid dehydrogenase와 같은 지방형성 유전자의 발현을 조절하는 주요한 전사인자 중 하나이다(Choe *et al.* 2016).

2.3.2 비만으로 인한 지방조직의 변화

비만은 제 2형 당뇨병이나 관상동맥질환 등과 같은 질환의 주요 원인 중 하나로 손꼽히는데, 비만에서 관찰되는 만성적인 지방조직 염증반응이 이 기전에 기여한 것으로 보이며(Kalupahana *et al.* 2012), 이는 지방조직 내 면역 세포의 구성과 기능의 변화와 깊은 관련이 있다(Lumeng *et al.* 2011).

지방조직 내에 존재하는 면역세포는 염증성 혹은 항 염증성 사이토카인을 활발하게 분비한다. 마른 지방조직과 비만한 지방조직에 존재하는 면역세포의 종류 및 분비되는 사이토카인에는 차이가 있다 (Figure 2-4). 마른 지방조직에서는 Treg 세포, eosinophil, natural killer T (NKT)세포, 그리고 M2형의 대식세포가 주로 존재한다(Watanabe *et al.* 2013). 이러한 세포들은 항 염증성 사이토카인인 IL-4, IL-10, IL-13 등을 분비하여 지방조직 내 항상성을 유지하며 염증반응을 억제시킨다.

반면 비만한 지방조직에는 M1 대식세포로 대표되는 염증성 면역세포들이 다수 침윤된다 (Figure 2-4). 고지방식으로 유도된 비만은 지방조직의 대식세포와 호중구를 증가시킨다고 보고되었다. 특히 이는 지방조직에 침윤된 M1 대식세포에서 분비되는 MCP-1에 의해 가속화된다. 마른 지방조직의 경우 면역세포 중 대식세포의 비율이 10% 미만인 반면 비만한 지방조직의 대식세포의 비율은 50% 이상인 것으로 추정된다(Weisberg *et al.* 2003). 더불어 비만에서 증가하는 지방조직 내 대식세포 수의 증가는 지방세포의 크기 증가에 비례한다. M1 대식세포는 TNF- α 와 IL-6와 같은 염증성 매개물질을 분비하는데, 이는 지방조직에 축적된 CD8 T 세포와 호중구에 의해 야기된 것으로 보고되기도 하였다(Elgazar-Carmon *et al.* 2008, Nishimura *et al.* 2009). 하지만 지방조직에서의 염증을 일으키는 면역세포의 침윤 순서는 아직 명확히 밝혀진 바가 없다. 지방조직의 염증 조절에 CD4 T세포의 균형이 중요한데, 비만한 지방조직에서는 CD4 T 세포 중 IL-17과 IL-

11를 분비하는 Th1와 Th17 세포는 증가하고 Treg 세포는 감소한다고 보고되었다(Fabbrini *et al.* 2013). 게다가 비만한 지방조직에서 B 세포는 IgG 항원과 염증성 사이토카인을 생성하여 인슐린 저항성을 야기한다고 알려졌다(DeFuria *et al.* 2013). 비만한 경우 지방조직에서 분비가 증가되는 사이토카인의 특징과 기능은 **Table 2-3**에 제시하였다.

지방조직의 내재면역반응은 toll-like receptors (TLRs)와 nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors (NLRs)와 같은 형태인지 수용체(PPRs)가 lipopolysaccharide(LPS), peptidoglycan(PGN), 박테리아 DNA 및 지방산등과 결합하는 반응을 통해 촉진된다(Chen *et al.* 2010). TLR은 막을 관통하는 glycoprotein으로 TLR4는 LPS와, TLR2는 PGN과 결합하여 반응을 야기하며, 지방세포에서 유래한 유리지방산과도 반응하는 것으로 알려졌다. 이러한 TLR의 반응은 MyD88단백질을 모이게 하여 NF- κ B와 MAPK의 활성화를 유발하여 염증성 사이토카인의 분비를 증가시킨다. TLR2와 TLR4의 발현은 비만한 사람의 지방조직과 혈액에서 증가하였으며, 함께 증가한 TNF- α 와IL-6의 발현과도 양의 상관관계를 보였다(Ahmad *et al.* 2012). 또한 고지방식이로 비만을 유도한 TLR2 KO 마우스에서 대식세포의 침윤이 줄었고, 염증성 사이토카인의 분비의 감소가 관찰된 것으로 보아(Himes *et al.* 2010), TLR2와 TLR4는 비만이 야기한 지방조직의 염증반응에 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있다.

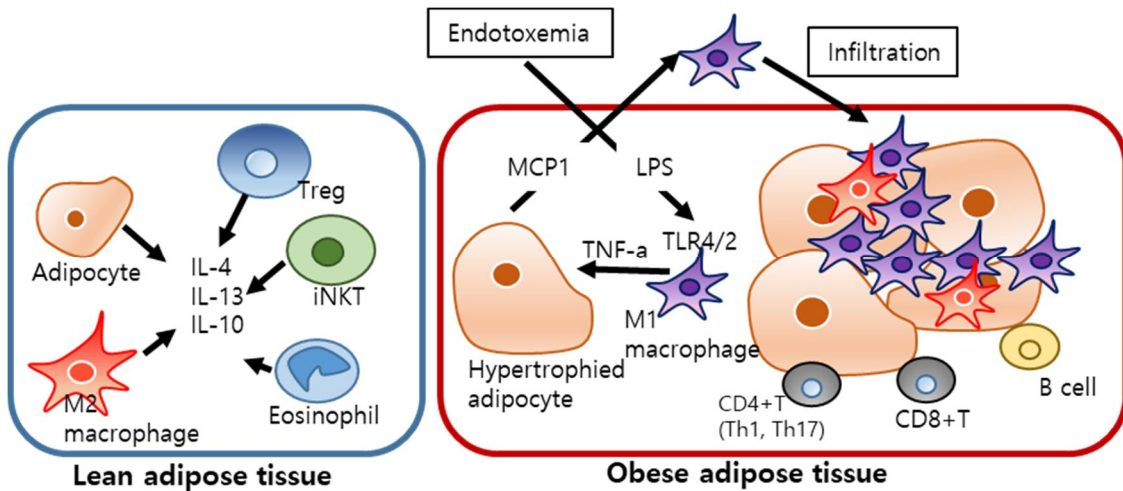


Figure 2-4. Inflammatory changes in adipose tissue and pancreatic islets associated with obesity (Watanabe *et al.* 2013).

Inflammatory changes in adipose tissue and pancreatic islets in association with obesity. In the lean state, regulatory T (Treg) cells, eosinophils, invariant natural killer T (iNKT) cells, M2-like resident macrophages, and adipocytes secrete anti-inflammatory cytokines including interleukin (IL)-4, IL-13 and IL-10 and suppress inflammation in adipose tissue. However, in the obese state, macrophages are activated by recognition of free fatty acids (FFAs) from hypertrophied adipocytes or lipopolysaccharide (LPS) through the Toll-like receptor (TLR) 4/myeloid differentiation protein-2 (MD-2) complex to induce tumor necrosis factor- α (TNF- α) production. Adipocytes secrete monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) in response to TNF- α and promote infiltration of macrophages into adipose tissues. In addition, CD4+ or CD8+ T cells and B cells infiltrate adipose tissue during obesity and exaggerate adipose tissue inflammation. FFAs such as palmitate from adipocytes may activate TLR4/MD-2 expressed in cells and induce the production of chemokines, chemokine (C-X-C motif) ligand 1 (CXCL1) and MCP-1. In response to these chemokines, macrophages infiltrate into islets. Cytokines such as TNF- α and IL-1 β from macrophages and contact interactions between cells and macrophages lead to cell dysfunction.

Table 2-3. Function and distribution of pro-inflammatory cytokines (Makki *et al.* 2013)

Adipokine	Distribution	Function
TNF α	Expressed by macrophages and adipocytes (visceral WAT > subcutaneous WAT)	Affects insulin and glucose metabolism. Provokes insulin resistance and stimulates lipolysis
IL-6	One-third of total circulating levels are expressed predominantly by adipocytes Also expressed in macrophages, skeletal muscle, endothelial cells, and fibroblasts	Controversial role in the development of insulin resistance. Affects glucose metabolism
IL-1 β	Secreted mainly by adipocytes and macrophages	Role in macrophages chemotaxis and thermogenesis
MCP-1	Secreted by adipose tissue	Affects insulin sensitivity and increases macrophage recruitment in adipose tissue and inflammation

2.3.3 지방조직에서 1,25(OH)₂D가 염증반응에 미치는 영향

지방조직을 구성하는 지방세포와 면역세포 모두에 VDR과 CYP27B1이 존재하므로 1,25(OH)₂D 혹은 25(OH)D는 지방조직을 구성하는 세포에 작용하는 것으로 알려져 있다. 지방세포에서는 1,25(OH)₂D가 세포 막의 mVDR과 결합하여 세포 내로 들어가거나, 지방세포 속으로 들어간 25(OH)D가 CYP27B1에 의해 hydroxylation되어 1,25(OH)₂D가 될 것으로 예상되나 어떻게 세포 안으로 들어가는지에 대해서는 정확하게 알려진 바가 없다. 세포 내로 들어간 1,25(OH)₂D는 핵막의 nVDR에 결합하여 핵 속의 VDRE에 결합하여 유전자의 전사를 촉진한다(Abbas 2017). 대식세포도 지방세포와 마찬가지로 1,25(OH)₂D가 세포 막의 mVDR과 결합하여 들어갈 수 있으나 규명된 바는 없으며, 25(OH)D가 megalin과 결합하거나, 단순수동확산을 통해 세포로 들어가 hydroxylation되어 1,25(OH)₂D가 되어 핵막의 VDR과 결합한다고 알려졌다(Chun *et al.* 2008).

지방조직의 지방세포와 면역세포는 모두 비만한 지방조직의 염증반응에 기여하지만 지방세포보다 SVC가 더 염증성 사이토카인 생성에 기여한다고 알려졌다(Fain 2010). 하지만 비만한 경우 지방세포의 크기와 수가 증가하므로 지방조직의 염증반응에 지방세포가 미치는 역할도 상당하다. 대부분의 선행연구가 지방세포의 염증반응에 1,25(OH)₂D가 미치는 영향을 연구하였으며 지방조직 내 존재하는 면역세포에 1,25(OH)₂D가 미치는 영향을 연구한 경우는 거의 없다(Chirumbolo 2015). 지방세포와 지방조직의 염증반응에 비타민 D가 미치는 영향에 관한 선행연구들은 Table 2-4에 제시하였다. 여러 *in vitro* 실험을 통해 1,25(OH)₂D는 지방세포와 pre-adipocyte에서 분비되는 염증성 반응을 완화시키는 것이 밝혀졌다. 하지만 마우스와 사람의 성숙한 지방세포에 1,25(OH)₂D를 처리한 결과는 상반된 결과를 보였는데, Sun 등(2007, 2008)은 1,25(OH)₂D에 의해 IL-6와 TNF α 의 분비가 증가한다고 보고한 반면, Mutt 등(2012)은 1,25(OH)₂D에 의해 IL-6와 NF- κ B의 분비가

감소한다고 보고하였다. 1,25(OH)₂D를 pre-adipocyte에 처리한 연구에서는 1,25(OH)₂D에 의해 MCP-1, IL-1 β , IL-6의 분비가 감소한다고 하였다(Marcotorchino *et al.* 2012, Karkeni *et al.* 2015).

1,25(OH)₂D가 지방조직에서 염증반응을 완화시키는 기전은 지방조직을 구성하는 세포에 존재하는 TLR의 발현을 조절하여 이후 MAPK signaling과 NF- κ B 경로에 영향을 미치는 것으로 보인다 (**Figure 2-5**). 대장암 유발 모델의 마우스의 장세포에서 비타민 D가 TLR4와 결합하여 염증반응을 완화시킨다는 보고가 있으며(Murillo *et al.* 2010), 사람 혈액의 단핵구에 *in vitro* 1,25(OH)₂D 처리 시, TLR2와 TLR4의 발현이 감소되었고 결과적으로 이는 NF- κ B와 RelA이 핵으로 이동하는 것을 억제하였다(Cohen-Lahav *et al.* 2006). 뿐만 아니라 사람의 peripheral blood mononuclear cell(PBMC)와 마우스의 골수세포에서 1,25(OH)₂D는 MAPK phosphatase 1(MKP1)의 발현을 증가시킴으로써 IL-6와 TNF α 생성을 감소시켰다(Zhang *et al.* 2012). MKP1은 MAPK의 음성 피드백에 필수적이며, MKP1이 저하되면 지방세포가 커지는 과정에서 MCP-1이 생성된다고 알려져 있다.

더불어 비타민 D는 면역세포의 비율과 증식에도 관여하므로 이를 조절하여 지방조직의 염증반응을 완화시킬 가능성 또한 존재한다. 당뇨병 신장질환 마우스에 1,25(OH)₂D를 섭취시킨 경우 염증반응에 관여하는 대식세포 중 M1형이 감소하고 M2형이 증가하는 것이 확인되었으며, 비만마우스에 다량의 비타민 D를 섭취하였을 때도 지방조직 내 M1형 대식세포가 감소하는 것이 확인되었다 (Zhang *et al.* 2014, Karkeni *et al.* 2015). 비타민 D는 T 세포의 조절과 활성화에도 관여하는데 비타민 D는 T 세포 중에서도 iNKT 세포와 CD8 T 세포의 발달에 필요하다는 연구들이 보고되었다(Yu *et al.* 2008). 지방세포에서 iNKT 세포의 역할은 명확히 규명되지는 않았지만, Treg 세포와 함께 IL-10과 같은 조절 사이토카인의 생성을 촉진하는 것으로 보인다(Lynch 2014). 하지만 이에 대해서는 더 연구가 필요한 실정이다.

1,25(OH)₂D가 지방세포의 염증에 미치는 효과에는 상반된 연구결과가 존재하며, 면역 세포주가 아닌 지방조직에 존재하는 면역세포에 1,25(OH)₂D가 미치는 효과를 본 선행연구가 거의 없으므로 이에 관한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 또한 비만이 지방조직 내 만성적인 염증반응을 유발하는 원인이므로 비만 모델에 비타민 D를 급여하여 지방조직 내 면역세포에 비타민 D가 미치는 영향을 확인할 필요가 있다.

Table 2-4. 1,25(OH)₂D₃ and inflammation (Mutt *et al.* 2014)

Cell type	1,25(OH) ₂ D ₃ mechanism of action	References
Human monocyte (PBMC)	Reduction in TLR2, TLR4, TLR9, and inhibited NF-κB nuclear translocation	(Sadeghi <i>et al.</i> 2006)
Mouse 3T3-L1 and human adipocytes (differentiated from subcutaneous preadipocytes)	Increased IL-6 and TNFα in mouse 3T3-L1 Increased IL-6 and IL-8 in human adipocytes	(Sun <i>et al.</i> 2007)
Mouse 3T3-L1 and human adipocytes (differentiated from subcutaneous preadipocytes)	Increased CD13, MIF, M-CSF, MIP, TNFα, IL-6, and MCP-1-	(Sun <i>et al.</i> 2008)
Mouse 3T3-L1 and Swiss mice on HFD supplemented with 1,25(OH) ₂ D ₃	Reduction in IL-6 in both cell culture medium and tissue EFP	(Lira <i>et al.</i> 2011)
Preadipocytes isolated from human subcutaneous WAT	Reduction in MCP-1 and adiponectin	(Lorente-Cebrian <i>et al.</i> 2012)
Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells and mature adipocytes from subcutaneous adipose tissue PBMC	Reduction in IL-6 and inhibited NF-κB nuclear translocation	(Mutt <i>et al.</i> 2012)
Bone marrow-derived mouse cell	Decreased IL-6 and TNFα in human PBMC Increased MKP-1 in PBMC and mice bone marrow cell	(Zhang <i>et al.</i> 2012)
Mouse 3T3-L1 and human preadipocytes	Decreased IL-6, MCP-1, IL-1B, and inactivation of NF-κB by inducing IκBa, decreased p38 phosphorylation	(Marcotorchino <i>et al.</i> 2012)
Human subcutaneous adipose tissue fragments	Reduction in MCP-1, IL-6, and IL-8	(Wamberg <i>et al.</i> 2013)
Human preadipocytes	Reduction in MCP-1, IL-8 and IL-6 and inactivation of NF-κB by upregulation of IκBa	(Gao <i>et al.</i> 2013)
Human preadipocytes differentiated to mature adipocytes	Reduction in MCP-1, IL-8, RANTES, IL-6, and IL-1β	(Ding <i>et al.</i> 2013)
Mouse adipose tissue fragment	Increased leptin	(Kong <i>et al.</i> 2013)
Mouse 3T3-L1, human adipocytes, mice on HFD supplemented with 1,25(OH) ₂ D ₃	Decreased IL-6, MCP-1, IL-1β, MCP-1, IL-8, RANTES in mice Decreased MCP-1, IL-8, RANTES in human adipocyte	(Karkeni <i>et al.</i> 2015)

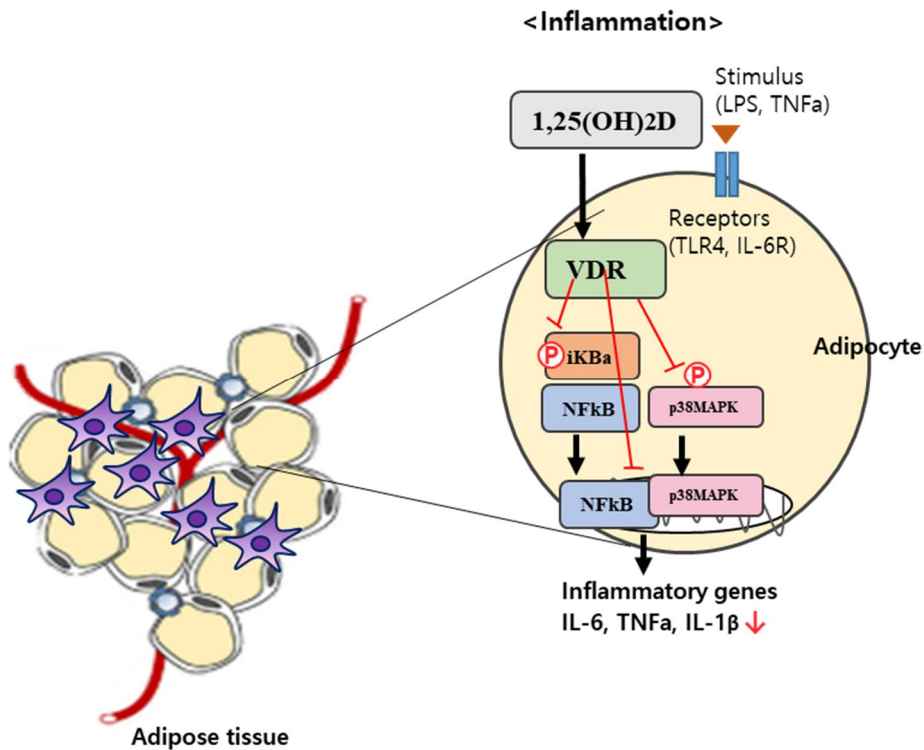


Figure 2-5. Molecular actions of 1,25(OH)₂D₃ in inflammation and energy homeostasis in adipocytes (Mutt *et al.* 2014).

Stimulation via e.g., lipopolysaccharide (LPS), TNF-α via specific receptors e.g., Toll like receptor (TLR), IL-6 receptors (IL-6R) activate Nuclear factor kappa-B (NFκB) or p38 mitogen-activated protein kinase (P38MAPK) signaling dependent transcription of inflammatory genes such as interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor alpha (TNF-α) and interleukin 1 beta (IL-1β). 1,25(OH)₂D₃ inhibits inflammation by inhibiting Inhibitor kappa-B (IκBα) phosphorylation and translocation of NFκB as well P38 MAPK into the nucleus.

Furthermore, 1,25(OH)₂D₃ affects energy homeostasis

.

제 3 장 비만이 비타민 D의 흡수와 조직 내 함량에 미치는 영향

3.1. 서론

비만은 전세계적으로 증가하고 있는 심각한 보건 문제로써, 개인의 관심과 더불어 세계보건기구 및 국가의 관심을 받고 있는 상황이다. 비만은 당뇨, 고지혈증, 고혈압과 같은 대사성 질환을 유발할 뿐만 아니라, 탄수화물, 지질, 철, 비타민 D 등 여러 영양소의 흡수 및 대사에도 영향을 미치는 것으로 알려졌다. 다수의 임상연구에서 비만한 사람의 혈중 25(OH)D가 상대적으로 낮다고 보고하였고, 메타분석 결과 비타민 D 부족의 유병률이 대조군에 비해 비만군에서 35%, 과체중군에서 24% 높다고 보고되었다(Cheng *et al.* 2010, Mai *et al.* 2012, Pereira-Santos *et al.* 2015). 비만에서 관찰되는 비타민 D 부족의 원인으로는 활동량 부족으로 인한 피부에서의 비타민 D 합성 저하, 증가한 지방조직에 비타민 D가 저장되어 상대적으로 혈중 비타민 D 농도가 낮아졌다는 가설 등이 제기되나, 아직 명확한 이유와 기전은 밝혀지지 않았다.

방사능 동위원소가 표지된 비타민 D를 섭취시킨 후 조직에 분포하는 방사능을 측정함으로써 지방조직에 비타민 D와 비타민 D의 대사체가 존재함이 확인되었다(Holman *et al.* 1970, Mawer *et al.* 1972). Wortsman 등(2000)은 비만군과 대조군에 같은 양의 비타민 D를 보충시키거나, 동일한 시간 자외선을 쬔 후 혈중 25(OH)D 농도를 측정하였는데, 그 결과 비만군의 25(OH)D의 증가 정도가 대조군에 비해 적음을 확인하였다. 이를 통해 비타민 D를 보충할 경우 비타민 D가 지방조직에 우선적으로 저장되기 때문에 생리적으로 이용 가능한 비타민 D가 감소한다고 추정하였다. Drincic 등(2012)은 체중과 혈중 25(OH)D

농도 사이에 선형관계가 아닌 *hyperbolic model* 관계가 있음을 코호트 연구를 통해 입증하였으며, 체내에 존재하는 총 비타민 D가 증가한 지방조직의 부피만큼 희석되어 비만에서 낮은 비타민 D 수준이 관측되는 것이라고 제안하였다. 하지만 비만한 사람의 혈중 25(OH)D 부족의 원인이 지방조직에 저장된 비타민 D 때문임을 직접적으로 규명하고, 실제 지방조직에 비타민 D가 얼마나 저장되어 있는지를 확인하기 위해서는 지방의 비타민 D 농도와 함량을 비교하여야 하는데, 지방조직에서 비타민 D를 추출하기가 어렵기 때문에 관련 연구가 많지 않다(Blum *et al.* 2008, Lipkie *et al.* 2013, Carrelli *et al.* 2017). 또한 임상연구의 경우 햇빛에 노출된 시간을 제한하기가 어렵고, 이를 제한하더라도 피부에서 합성되는 비타민 D가 나이, 계절, 자외선 차단제 등의 영향을 받으므로 사육환경의 통제가 가능한 동물연구를 통하여 비만과 비타민 D의 대사의 관계를 규명할 필요가 있다.

식이로 섭취한 비타민 D가 지방조직에 저장되는 기전은 아직 정확하게 알려진 바가 없다. 식이 중의 비타민 D가 소장세포 내에서 섭취한 다른 지방 성분과 함께 카일로마이크론을 형성한 후, 지방과 근육의 LPL에 의해 분해되어 지방조직으로 들어가거나 혈액의 DBP와 결합하여 혈액을 순환하는 것으로 알려져 있다. 소장 세포 내로 비타민 D가 흡수되는 기전은 농도 차에 의한 확산을 통한 흡수로 알려져 있으나, 최근 소장 벽에 있는 콜레스테롤 수송 단백질에 의해서도 비타민 D가 흡수된다고 알려진 바 있다(Reboul *et al.* 2011, Reboul 2015). 비만인 경우 혈액의 25(OH)D가 낮아지는 것과는 달리 비타민 D는 지방과 함께 섭취할 때 흡수율이 증가한다고 보고한 연구들이 있으며, 콜레스테롤 수송 단백질 역시 비만에 의해 발현이 조절된다고 보고되었다(Mulligan *et al.* 2010, Dawson-Hughes *et al.* 2013). 따라서 고지방식으로 유도된 비만은 지방조직에 저장되는 비타민 D의 양에 영향을 미칠 뿐만 아니라, 섭취한 비타민 D가 소화되고 흡수되는 과정에도 영향을 미치는 것을 볼 수 있다.

본 연구에서는 비만마우스에게 급여하는 비타민 D의 양을 부족, 대조, 보충 수준으로 달리하여 제공한 뒤, 비타민 D가 소화 흡수되고 조직에 저장되며 간에서 hydroxylation되는 과정을 대조 마우스의 과정과 비교해보고자 한다. 먼저 혈중 25(OH)D의 농도를 측정하였으며, 소장 상부에서 비타민 D의 흡수와 관계된 카일로마이크론의 형성 및 분해와 관계된 지표, 그리고 소장의 콜레스테롤 수송체의 발현을 확인하였다. 또한 비타민 D 섭취 정도에 따른 비만마우스와 대조마우스의 조직 내 비타민 D 함량을 비교하기 위하여 조직에서 비타민 D₃ 및 25(OH)D₃를 추출하는 방법의 유효성을 검증한 뒤, 간과 지방조직에서 비타민 D₃와 25(OH)D₃의 농도 및 함량을 측정하였다.

3.2. 연구방법

3.2.1. 실험 동물 및 식이

6주령의 수컷 C57BL/6N 마우스 (중앙실험동물, Seoul, Korea)를 서울대학교 수의과대학 동물 사육장의 specific pathogen free (SPF) room에서 사육하였다. 사육환경은 온도 ($23 \pm 1^\circ\text{C}$), 상대습도 ($50 \pm 10\%$), 명암 12시간 주기로 일정하게 조절되었다. 마우스는 모두 대조 식이로 5일 동안 적응 시킨 뒤, 군당 평균 체중이 유사하도록 8~10마리씩 서로 다른 실험식이를 제공하는 6군에 임의 배정하였다. 마우스의 식이 섭취량은 주당 4회 측정하였으며, 체중은 매주 1회 측정하였다. 총 13주의 실험 식이 기간이 끝난 뒤, 실험동물을 12시간 동안 금식시켰으며 이산화탄소 과호흡을 통하여 희생하였다. 실험 동물의 구입 및 사육, 희생의 전 과정은 서울대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee of Seoul National University)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다 (승인번호: SNU-141020-4).

실험 식이는 AIN-76 정제 식이 조성을 기본으로 하여 지방의 양 (대조식이; CON, 고지방식이; HFD), 비타민 D₃의 양 (부족, 대조, 보충)에 따라 총 6가지로 주문 제작 하였다 (CON_LVd, #119320; CON_CVd, #103816; CON_HVd, #119321; HFD_LVd, #119318; HFD_CVd, #103818; HFD_HVd, #119319; Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA). 실험 식이의 전체 조성은 **Table 3-1**에 나타내었다. 대조식이(CON)는 전체 칼로리 중 10%를 지방으로부터, 고지방식이(HFD)는 전체 칼로리 중 45%를 지방으로부터 공급하였다. 기본적으로 비타민 D 부족 식이(LVd)는 식이 1 kg당 비타민 D₃ 50 IU를, 비타민 D 대조 식이(CVd)는 비타민 D₃ 1,000 IU를, 비타민 D 보충 식이(HVd)는 비타민 D₃ 25,000 IU를 포함하도록 제조하였다. 하지만 실제 마우스는 대조 식이(CON)에 비해 적은 양의 고지방식이(HFD)를 섭취하므로, HFD를 섭취할 경우 적은 양의 비타민 D를 섭취할 가능성이 있으므로 HFD 식이에 포함된 비타민 D의 양을 증량할 필요가 있다.

또한 제조되는 실험 식이는 칼로리를 기준으로 중량이 조절되어 실제 각 실험 식이에 포함된 비타민 D₃의 양은 조금씩 차이가 있으며 그 값은 다음과 같다. CON_LVd식이는 48 IU/ kg, CON_CVd식이는 957 IU/kg, CON_HVd식이는 23,922 IU/kg, HFD_LVd식이는 58 IU/kg, HFD_CVd식이는 1,179 IU/kg, HFD_HVd 식이는 29,475 IU/kg의 비타민 D₃를 포함한다. 실험 식이는 실험 동물에게 제공되기 전까지 4℃에서 보관하였고, 실험 식이와 멸균된 식수를 자유급여 (*ad libitum*)로 제공하였다.

Table 3-1. Composition of the experimental diets^a

	CON (10% kcal fat)			HFD (45% kcal fat)		
	LVd (50 IU/kg of diet)	CVd (1,000 IU/kg of diet)	HVd (25,000 IU/kg of diet)	LVd (50 IU/kg of diet)	CVd (1,000 IU/kg of diet)	HVd (25,000 IU/kg of diet)
Casein (g)	200	200	200	200	200	200
L-Cystine (g)	3	3	3	3	3	3
Sucrose (g)	350	350	350	172.8	172.8	172.8
Cornstarch (g)	315	315	315	72.8	72.8	72.8
Dyetrose (g)	35	35	35	100	100	100
Soybean Oil (g)	45	45	45	45	45	45
t-BHQ (g)	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009	0.009
Lard (g)	-	-	-	157.5	157.5	157.5
Cellulose (g)	50	50	50	50	50	50
Mineral Mix (g)^b	35	35	35	35	35	35
Vitamin Mix (g) (No vit D)	10	-	10	10	-	10
Vitamin Mix^c (g)	-	10	-	-	10	-
Vit D3 Premix (100IU/g)	0.5	-	-	0.5	-	-
Vit D3 (400,000IU/g)	-	-	0.0625	-	-	0.0625
Choline Bitartrate (g)	2	2	2	2	2	2
Total (g)	1,045.5	1,045	1,045	848.6	848.1	848.2
kcal/g diet	3.69	3.69	3.69	4.64	4.64	4.64

^a Resource: Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA

^b 35 g of mineral mix (Dyets, #200000) provides 5.2 g calcium, 4 g phosphorus, 3.6 g potassium, 1 g sodium, 1.6 g chloride, 0.3 g sulfur, 0.5 g magnesium, 35 mg iron, 6 mg copper, 54 mg manganese, 30 mg zinc, 2 mg chromium, 0.2 mg iodine, 0.1 mg selenium, and 4.2 g sucrose.

^c 10 g of vitamin mix (Dyets, #300050) provides 4000 IU vitamin A, 1000 IU vitamin D3, 50 IU vitamin E, 30 mg niacin, 16 mg pantothenic acid, 7 mg vitamin B6, 6 mg vitamin B1, 6 mg vitamin B2, 2mg folic acid, 0.8 mg menadione, 0.2 mg biotin, 10 µg vitamin B12, and 9.8 g sucrose.

3.2.2. 신체조성 측정

13주의 실험 식이 기간이 끝난 뒤, 실험동물을 12시간 동안 금식시켰으며, 희생 직전 각 군당 두 마리씩 우레탄 마취시켰다. 25% 우레탄 용액을 1.5 g/kg의 용량으로 마우스에게 복강 주사하였다. 이후 Dual energy X-ray absorptiometry(DEXA) 방식의 Hologic Discovery DEXA instrument (Hologic, Toronto, ON, Canada)을 이용하여 체지방량과 골격근량을 측정하였다.

3.2.3. 희생 및 시료 수집

13주의 실험 식이 기간이 끝난 뒤, 실험동물을 12시간 동안 금식시켰으며 이산화탄소 과호흡을 통하여 안락사시켰다. 희생 직후 심장 채혈을 통해 약 700~1,000 μ L의 혈액을 얻었으며 십이지장, 공장, 회장, 간 및 백색지방조직 (신주위지방, 후복강 지방, 부고환 지방, 피하지방)을 분리하였다. 혈액은 상온에서 2시간 정치한 후 3,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 분리한 조직은 PBS (phosphate buffered saline) 용액으로 세척한 뒤 무게를 측정하였다. 혈청과 조직은 모두 분석 전까지 -80 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

3.2.4. 간의 중성지방 수준 측정

Folch 법을 이용하여 간으로부터 지질을 추출하였다(Folch *et al.* 1957). 30 mg의 간 조직을 2 mL 튜브에 넣고 200 μ L의 PBS 용액을 넣어 균질화하였다. 800 μ L의 chloroform과 400 μ L의 methanol을 추가한 뒤, 상온에서 17시간 교반하였다. 2,000 rpm, 4 $^{\circ}$ C에서 20분간 원심분리 한 후 하층액을 분리하여 새 튜브에 옮겨 담은 뒤 후드 내에서 질소가스로 증발시켰다. 이 후 isopropanol 200 mL에 재용해시켰다. 간의 중성지방

측정을 위해서는 중성지방 측정용 키트 (Asan pharmaceutical, Seoul, Korea)를 이용하여 비색정량 하였다. 96-well plate의 각 well에 재용해시킨 isopropanol과 표준 시료를 2 μ L넣은 후 300 μ L의 효소 시약을 추가로 분주하고 37°C에서 10분 반응시킨 후 분광광도계(Spectramax 190; Molecular devices, CA, USA)를 이용하여 550 nm에서 파장을 측정하였다. 표준 시료의 흡광도 값을 기준으로 표준곡선을 그려 간의 중성지방 농도를 계산하였다.

3.2.5. 혈청 25(OH)D 농도 측정

혈청 25(OH)D 농도는 방사면역측정법을 이용한 25-Hydroxyvitamin D 125I RIA Kit를 구입하여 측정하였다 (DiaSorin, Stillwater, MN, USA). 50 μ L의 혈청에 500 μ L의 acetonitrile(ACN)을 추가하여 섞어준 뒤 1,200 x g, 20°C 에서 10분간 원심분리하여 25(OH)D 및 다른 산화된 대사체를 혈청으로부터 추출하였다. 이후 5 mL 의 glass tube에 추출한 용액 및 표준액을 25 μ L씩 넣은 뒤 1 mL 의 goat anti 25(OH)D serum과 50 μ L of 125 I-25(OH)D를 추가로 분주하여 섞어준 뒤 90분간 상온에서 정치하였다. 이후, 다시 500 μ L의 Donkey anti goat 500 μ L를 넣은 뒤 상온에서 20분간 정치하였다. NSB 완충용액 500 μ L를 추가하여 섞은 뒤 1,800 x g, 20°C 에서 20분간 원심분리한 뒤 상층액을 버리고, 감마카운터 (2470 WIZARD 2, Perkin Elmer, Shelton, CT, USA)를 이용하여 방사능을 측정했다. 표준액의 방사능의 농도로 표준곡선을 그린 뒤 혈청 25(OH)D의 농도를 측정하였다.

3.2.6. 간과 지방조직에서 비타민 D3와 25(OH)D3 추출

3.2.6.1. 화학약품 및 시약

표준물질인 cholecalciferol (vitamin D₃), 25-hydroxy cholecalciferol (25(OH)D₃), 내부표준 물질인 6, 9, 19[d₃]-vitamin D₃와 6, 9, 19[d₃]-25(OH)D₃ 그리고 methyl tert-butyl ether (MTBE), formic acid (LC-MS grade), ammonium formate (≥99.0%)는 Sigma-aldrich (St. Louis, MO, USA)로 부터 구입하였다. Methanol, ethanol, ACN은 모두 LC-MS grade로 Fisher scientific (Pittsburgh, PA, USA)에서 구입하였고, Ultra-pure water는 LaboStar™ TWF UV 7을 (Siemens, MA, USA)을 이용하였다.

3.2.6.2. 샘플 전처리

간과 지방의 비타민 D₃와 25(OH)D₃ 추출 방법은 선행연구의 방법을 참고하였으며(Lipkie *et al.* 2013), 실험실에서 재현 가능한 방법으로 조금 수정한 뒤 식약처에서 발행한 “생체시료분석법 밸리데이션 해설서”에 근거한 방법으로 검증하여 이용하였다.

400 μ L의 간 또는 지방조직의 균질액 (33% w/w solution)에 비타민 D₃와 25(OH)D₃의 내부표준물질의 혼합물 (1 μ g/mL의 d₃-비타민 D₃ 와 d₃-25(OH)D₃, 용매: ACN) 10 μ L을 넣고 섞어준 뒤 15분간 상온에서 정치하였다. 검량곡선시료는 추가적으로 8가지의 농도의 외부표준물질인 비타민 D₃와 25(OH)D₃의 혼합물을 각각 10 μ L씩 0.01, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 1, 2, or 5 μ g/ mL 의 농도로 넣었으며, 분석하고자 하는 시료는 외부표준물질 대신 ACN 10 μ L을 넣어주었다.

400 μ L의 ACN 을 넣고 5분간 vortexing 한 후, 1,200 x g, 20℃ 에서 5분간 원심분리 하였다. 400 μ L의 MTBE을 추가적으로 넣어준 뒤 다시 5분간 vortexing하고, 1,200 x g, 20℃ 에서 5분간 원심분리 한 뒤 상층액을 다른 glass tube에 회수하였다. 이후, 400 μ L의 ACN 과 MTBE, 100 μ L의 PBS를 넣은 뒤 동일 조건으로 vortexing과 원심분리 한 뒤 상층액을

추가적으로 회수하였으며 이 과정을 한번 더 반복했다. 회수한 상층액을 후드 내에서 질소가스로 증발시킨 뒤 methanol 700 μ L 와 K₂HPO₄ (0.4 M) 300 μ L에 재용해 한다. Oasis HLB cartridges (1cc, 3 mL, Waters, Milford, MA, USA)을 이용하여 고상 추출했다. Manifold (Supleco, Park Bellefonte, PA, USA)에 카트리지를 설치하여 진공을 걸어준 뒤, ethanol, methanol, water을 각각 1 mL씩 넣어서 카트리지를 활성화시킨 뒤 재용해시킨 용매를 카트리지에 넣어주었다. 30%와 70%(간: 70%, 지방조직: 60%)의 methanol을 각각 1 mL씩 넣어 카트리지를 씻어준 뒤 ACN으로 (간: 2 mL, 지방: 3 mL) 카트리지에 남아있는 물질을 용출시켰다. 추출하는 용매 및 순서는 **Figure 3-1**에 자세히 기술하였다.

3.2.6.3. PTAD 유도체화

4-Phenyl-1,2,4-triazole-3,5-dione (PTAD, Sigma, USA)는 소량의 물과도 반응하므로 PTAD는 dry ACN (Fisher scientific, USA)에 용해시켰으며, 4 mg/mL의 농도를 맞추었다. ACN으로 용출시킨 용매는 후드 안에서 질소가스로 바짝 말린 뒤 100 μ L의 4 mg/mL의 PTAD 용매를 넣어 1 시간 동안 vortexing 한 뒤 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

3.2.6.4. LC-MS/MS (liquid chromatograph-mass spectrometer)

분석은 LCMS-8040 triple quadrupole mass spectrometer with Shimadzu Nexara X2 UHPLC (Shimadzu, Kyoto, Japan)을 이용하였다. Kinetex® C18 컬럼을 (100 × 2.1 mm, 2.6 μ m, Phenomenex, Torrance, CA, USA)을 SecurityGuard™ Ultra 가드컬럼(Phenomenex)과 함께 사용하여 분석하고자 하는 특정 물질의 피크를 분리하였다. 오븐의 온도는 40°C이며 이동상 A는 (0.1% formic acid, 5mM methylamine, 용매: water) 이동상 B는 (0.1% formic acid, 용매: methanol)을 사용하였으며, 흐름 속도는 0.2 mL/min 였다. 이동상의 조건은 Table 3-2와 같다. 시료주입량은 5 μ L이며, ESI positive mode에서 분석하였다. 자세한 LC-MS/MS 조건은 Table 3-3에 나타내었다.

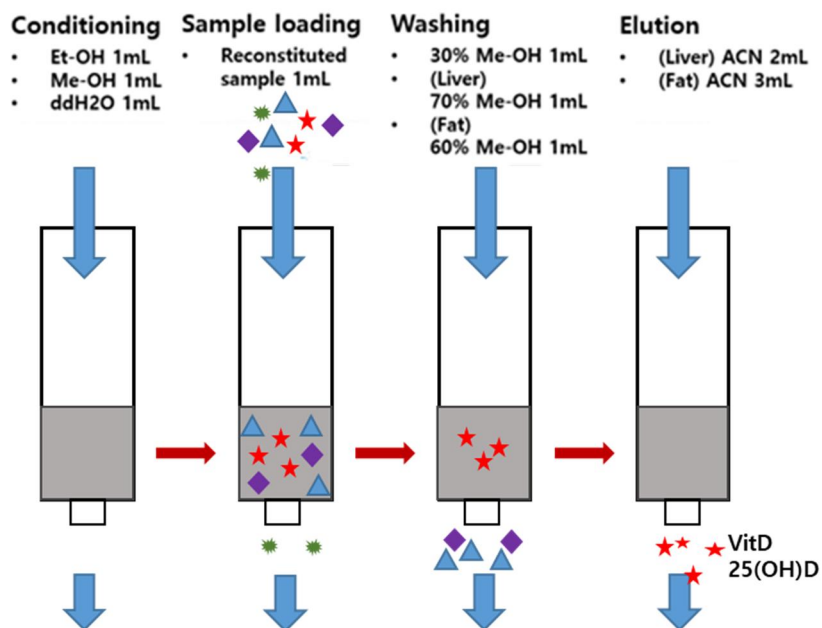


Figure 3-1. Solid phase extraction process of vitamin D and its metabolites (Lipkie *et al.* 2013)

각각의 물질은 multiple reaction monitoring (MRM)을 이용하여 분석하였으며, 머무름 시간은 각각 ± 1 분 10초였다. 데이터 처리는 LabSolutions (version 5.60)을 이용하였다.

3.2.6.5. 분석법 검증

확립된 분석법을 검증하기 위하여, 직선성(linearity), 정확도(accuracy), 정밀도(precision), 회수율(recovery)을 확인하였다. 정밀도는 일내(intraday), 일간(inter-day)으로 평가하였다. 식이 kg당 50 IU 비타민 D₃을 함유한 사료를 15주간 섭취하여 비타민 D가 결핍된 22주령의 C57BL6/N 마우스의 간과 지방조직을 품질관리시료로 이용하여 정확도를 평가하였다. 품질관리시료는 시료/PBS의 무게비율이 33%가 되도록 PBS를 추가한 뒤 homogenizer (IKA homogenizer, Sigma Aldrich)를 이용하여 균질화하였으며, 분석 전까지 -80℃에서 보관하였다.

검량곡선은 비타민 D₃와 25(OH)D₃의 8 가지 농도(1, 2, 5, 10, 20, 100, 200 또는 500 ng/ mL, 조직 g 당 농도 0.75, 1.5, 3.75, 7.5, 15, 75, 150, 또는 375 ng/ g)를 이용하여 작성하였다. 각 농도에 해당하는 표준용액을 조직의 균질액에 첨가하여 전처리를 거친 후 분석하였으며 선형 추세선과 상관계수를 산출하였다.

1) 정확도

비타민 D가 결핍된 마우스의 간 또는 지방조직에 시료/PBS의 무게비율이 33%가 되도록 PBS를 추가한 뒤 균질화 하였으며 이를 세 농도(1.5, 7.5, 또는 75 ng/ g tissue)에서 품질관리 시료 균질액과 비교하였다.

Table 3-2. LC-MS/MS solvent gradients for vitamin D3 and 25(OH)D3

Time (min)	Mobile phase	
	A ¹⁾ (%)	B ²⁾ (%)
0.5	80	20
1	30	70
18.5	1	99
21.5	1	99
22.0	80	20
27.0	80	20

¹⁾ 0.1% formic acid in water

²⁾ 0.1% formic acid in methanol

Table 3-3. LC-MS/MS conditions for vitamin D analysis

Description		Condition
LC	Instrument	Shimadzu Nexara X2 UHPLC
	Column	Kinetex® C18 column (100 × 2.1 mm, 2.6 µm) SecurityGuard™ Ultra guard column
	Flow rate (ml/min)	0.2
	Injection vol.(µL)	5
MSMS	Instrument	Shimadzu LCMS-8040 triple quadrupole mass spectrometer
	Ionization	ESI positive mode
	Nebulizing gas flow	3 L/min
	Drying gas flow	15 L/min
	DL temp (°C)	250
	Heat block temp (°C)	400

균질액 400 μ L에 비타민 D3와 25(OH)D3의 내부표준물질의 혼합물 (1 μ g/mL의 d3-비타민 D3와 d3-25(OH)D3) 10 μ L와 외부표준물질의 혼합물 (0.02, 0.1, 또는 1 μ g/ mL) 10 μ L을 넣고 섞어준 뒤 15분간 상온에서 정치하였다. 이후 방법은 3.2.6.2와 동일하다. 정확도는 측정한 샘플의 농도 값을 품질관리시료의 농도 값으로 나눈 뒤 100을 곱한 퍼센트로 나타내었으며 3일 동안 반복하였다.

2) 정밀도

일내 정밀도는 품질관리시료에 세 농도 (1.5, 7.5, 또는 75 ng/ g tissue)의 표준물질을 첨가한 시료를 하루 안에 3반복 분석하여 측정하였다. 일 간 정밀도도 품질관리시료에 세 농도 (1.5, 7.5, 또는 75 ng/ g tissue)의 표준물질을 첨가한 시료를 3일 간 반복 실험하여 평가하였다. 정밀도는 상대 변동계수값 (%CV= 표준편차 /평균 X100)을 이용하여 나타내었다.

3.2.7. 조직 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR 분석

1) RNA 추출

간, 십이지장, 공장, 그리고 부고환 지방조직에서 Trizol reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)를 이용하여 RNA를 추출하였다. Trizol 용액 1 mL를 분주하고 균질화한 뒤 5분 동안 상온에 두었다. 200 μ L의 chloroform (Sigma Aldrich, USA) 을 넣고 vortexing 후 3분간 상온에서 정치한 뒤 12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 15분간 원심분리하고 상층액을 새로운 튜브에 옮겼다. Isopronaol (Sigma Aldrich, USA)을 500 μ L씩 넣고 섞어준 뒤 상온에 10 분 동안 두었다가 12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 10분간 원심분리하여 pellet을 얻었다. 상층액을 버린 후에 pellet을 1 mL의 75% ethanol로 씻어준 뒤, 7,500 \times g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 2분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다. 남은 pellet은 상온에서 건조시킨 후에 0.05%

diethyl pyrocarbonate (DEPC)-treated distilled water (DW) 20 μ L로 완전히 용해시켰다. nano-spectrophotometer (NANO-200, BIOAND Co., Gyeonggi, Korea)를 이용하여 RNA 농도 및 순도를 확인하였고 agarose젤에 RNA를 내린 뒤 Gel Doc XR system을 이용하여 RNA의 질을 확인한 뒤에 cDNA 합성 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

2) cDNA 합성

PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit (Takara, Otsu, Shiga, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 0.5 μg μ L로 준비된 RNA stock 4 μ L, dNTP Mixture (10 mM each) 1 μ L, Oligo dT Primer (50 μM) 1 μ L, RNase free DW 4 μ L를 PCR tube에 넣고 총 10 μ L의 RNA-primer mixture를 만들었다. 그리고 순차적으로 65°C 및 4°C 조건에서 각각 5분 동안 incubation한 후 5 X PrimeScript Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5 μ L, PrimeScript RTase (200 U/ μ L) 1 μ L, RNase free DW 4.5 μ L를 더하여 총 20 μ L의 reaction mixture를 만들었다. 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)로 42°C 에서 50분, 95°C 에서 5분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 분석 전까지 -20°C 조건으로 보관하였다.

3) Real-time PCR

합성한 cDNA를 10배 희석한 뒤, 8-tube strip (0.2 mL)에 cDNA 1 μ L, DW 7.8 μ L, SYBR Premix Ex Taq (2X) 10 μ L, ROX reference dye (50X) 0.4 μ L, forward 및 reverse primer 각각 0.4 μ L씩 분주하였다. StepOne™ Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 반응시켰다. 각 유전자 별 primer 염기 서열은 **Table 3-4**에 나타내었다. 반응 조건은 95°C 에서 30초의 반응단계 (initiation step)와 95°C 에서 10초의 변성단계 (denaturation step)를 거쳐 60°C 에서 30초간 결합 및 증폭단계 (annealing step)를 40회 반복하였다. 모든 실험은 duplicate으로 분석한 뒤 평균값을 얻었고,

Table 3-4. Primer sequences used in real-time PCR

Gene ¹	Forward primer	Reverse primer
<i>Cyp2r1</i>	TGGTGAGGTAAATGAGGCTTTC	TGCCAGTGCTCCAGTCTTC
<i>Cyp27a1</i>	CCAAGGCAAGGTGGTAGAGA	CTTCATCGCACAAGGAGAGC
<i>Mtp</i>	TCTGGCTGAGGTGGGAATAC	CACTCAGGCAATTCGAGACA
<i>Sr-b1</i>	AATGCTCCTTTGGGTAGGG	GCCCCCGATACTCTGTTTG
<i>Npc1l1</i>	TGTTTGGTATGGAGAGTGTGGA	GTCACAGCAGAGACTGACATTG
<i>Cd36</i>	CCAAGCTATTGCGACATGATT	TCTCAATGTCCGAGACTTTTCA
<i>Abca1</i>	CCTCACATCCTCATCCTCGT	CGCTCTCTTGGGACTTGGTA
<i>Lpl</i>	GGGGTTTTCTTCATTCAGCA	ACACATTTACCAGGGGGTCA
<i>Lrp1</i>	GACCAGGTGTTGGACACAGATG	AGTCGTTGTCTCCGTCACACTTC
<i>Dbp</i>	GTCCGAGTGTCTTCTCCACCA	TCTGTTGCCTGTTTCAGCAC
<i>Gapdh</i>	GGAGAAACCTGCCAAGTA	AAGAGTGGGAGTTGCTGTTG

¹ *Cyp2r1*, cytochrome P450 2R1; *Cyp27a1*, cytochrome P450 27A1; *Mtp*, Microsomal triglyceride transfer protein; *Sr-b1*, Scavenger receptor class B type1 ; *Npc1l1*, Niemann-Pick C1-Like 1; *Cd36*, cluster of differentiation 36 ; *Abca1*, ATP-binding cassette transporter A1 ; *Lpl*, lipoprotein lipase; *Lrp1*, Low density lipoprotein receptor-related protein 1 ; *Dbp*, vitamin D binding protein; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

house-keeping 유전자인 *Gadph*의 발현량으로 보정하였다. $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 계산법으로 대조군의 발현량을 기준으로 하여 상대정량 하였다.

3.2.8 통계 분석방법

모든 통계분석은 SPSS Statistics version 23 software (IBM SPSS Statistics, Chicago, IL, USA)을 사용하여 수행되었다. 식이로 섭취한 비타민 D와 식이의 지방량이 비타민 D의 대사에 미치는 영향을 분석하기 위해 이원배치 분산분석 (Two-way ANOVA)를 수행하였다. 분산분석 결과가 유의적일 경우, Fisher's least significant difference (LSD) 검정으로 사후검정 하였다. 비타민 D 섭취정도와 식이 지방량 사이에 교호작용이 존재하는 경우에는 대조군과 고지방식이군 사이에 독립 *t* 검정을 실시하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (means \pm SEM)로 표기되었으며, 통계 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 이루어졌다.

3.3. 연구결과

3.3.1. 체중, 체지방량, 간 무게 및 간의 중성지방 수준

실험동물의 체중, 조직 무게, 식이섭취량 결과 및 간의 중성지방 농도를 **Table 3-5**에 제시하였다. 초기 체중은 군간에 유의적인 차이가 없었으나, 13주차 체중은 HFD군이 CON군보다 38.5% 더 높았다 ($P < 0.001$). HFD군의 백색 지방량 또한 CON군의 값보다 105.8% 더 높았다 ($P < 0.001$). 비타민 D 섭취에 의한 체중 및 백색 지방량의 차이는 없었다. 평균 식이 섭취량 (g/day)은 고지방식이 섭취 혹은 비타민 D 섭취 정도에 의해 영향을 받지 않았다.

체중 100 g당 간 무게는 HFD군이 CON군보다 높았으며 ($P < 0.001$), 간 조직 g당 중성지방의 수준도 CON군에 비해 HFD군의 값이 유의적으로 더 높았다. 비타민 D 섭취는 간 무게나 간의 중성지방 농도에 영향을 미치지 않았다.

Table 3-5. Body weight, weight gain, body fat, and dietary intake of mice in the CON and HFD groups fed different levels of vitamin D¹

	CON			HFD			<i>P</i> -value		
	LVd (n=9)	CVd (n=12)	HVd (n=8)	LVd (n=9)	CVd (n=11)	HVd (n=8)	Fat amount	Vitamin D content	Interaction
Body wt. at 13 week (g)	35.8 ±1.0 ^a	35.1 ±0.4 ^a	34.5 ±1.1 ^a	49.5 ±0.7 ^c	49.5 ±0.9 ^c	46.7 ±0.8 ^b	< 0.001	0.052	0.435
WAT wt² (g)	2.91±0.31 ^a	2.81 ±0.21 ^a	2.64 ±0.29 ^a	5.59 ±0.09 ^b	5.90±0.11 ^b	5.70 ±0.21 ^b	< 0.001	0.67	0.571
Daily food intake (g/day)	2.96 ±0.09	2.97 ±0.09	3.03 ±0.07	3.03 ±0.09	3.23 ±0.19	2.80 ±0.08	0.786	0.424	0.242
Liver wt. per body wt. (g/ 100g body wt.)	3.22±0.14 ^a	3.41 ±0.13 ^a	3.34 ±0.09 ^a	5.24 ±0.13 ^c	4.74± 0.23 ^{bc}	4.37 ±0.29 ^b	< 0.001	0.152	0.231
Liver TAG (mg/ g tissue)	57.2±5.0 ^a	54.53 ±8.0 ^a	63.6 ±6.4 ^a	138.3±10.1 ^b	127.7±12.9 ^b	111.7±12.8 ^b	< 0.001	0.613	0.271

¹Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D amounts, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. Data are presented as mean ± SEM

²White adipose tissue weight included epididymal, subcutaneous, retroperitoneum, and perinephric fat.

CON_LVd, 10% kcal fat + Low vitamin D diet; CON_CVd, 10% kcal fat + Control vitamin D diet; CON_HVd, 10% kcal fat + High vitamin D diet;
HFD- _LVd, 45% kcal fat + Low vitamin D diet ; HFD_CVd, 45% kcal fat + Control vitamin D diet ; HFD_HVd, 45% kcal fat + High vitamin D diet .

3.3.2. 혈청 25(OH)D 농도

식이로 섭취한 비타민 D는 혈청 25(OH)D 농도에 유의적인 영향을 미쳤으며(**Figure 3-2**), 섭취한 비타민 D의 양과 혈청 25(OH)D사이에는 유의적인 양의 상관관계가 존재하였다 ($r = 0.932$, $P < 0.001$). 비타민 D 섭취와 고지방식이 섭취 사이에는 교호작용이 존재하였기 때문에 ($P < 0.001$), 비타민 D 섭취 정도에 따라 CON군과 HFD군 사이에 혈청 25(OH)D 농도에 있어 다른 양상이 관측되었다. 비타민 D를 보충하였을 때 HFD군의 25(OH)D 농도가 CON군의 값에 비해 19.7% 낮았던 반면 ($P < 0.001$), 비타민 D를 부족하게 섭취하였을 때는 HFD군의 25(OH)D 농도가 CON군의 값에 비해 76.6% 높은 경향성을 보였다 ($P = 0.054$).

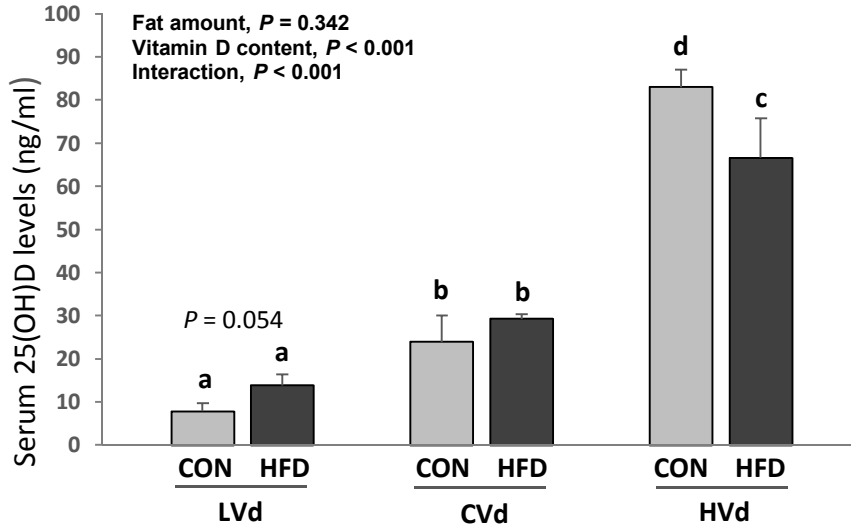


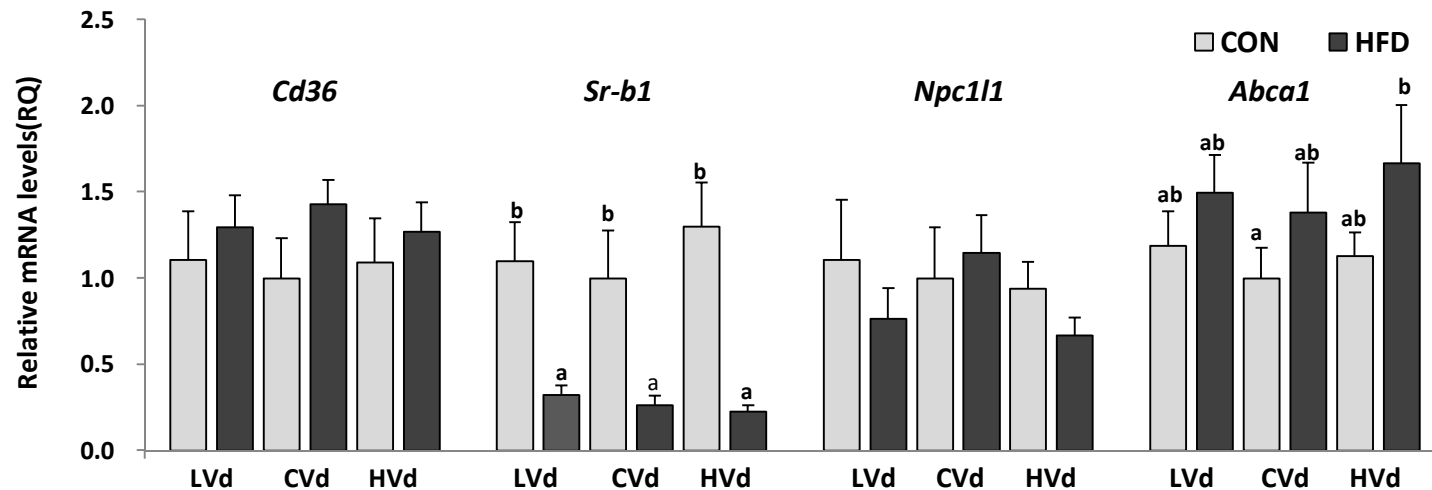
Figure 3-2. Serum 25(OH)D levels (ng/ mL)

Data are presented as mean \pm SEM, $n = 6$ for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON_LVd, 10% kcal fat + Low vitamin D diet; CON_CVd, 10% kcal fat + Control vitamin D diet; CON_HVd, 10% kcal fat + High vitamin D diet; HFD_LVd, 45% kcal fat + Low vitamin D diet ; HFD_CVd, 45% kcal fat + Control vitamin D diet ; HFD_HVd, 45% kcal fat + High vitamin D diet .

3.3.3. 소장에서 비타민 D의 흡수 관련 지표의 발현량

고지방식이 및 비타민 D 섭취가 소장에서의 비타민 D 흡수에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, 소장상부(공장)에서 비타민 D 흡수에 관여한다고 알려진 콜레스테롤 수송체들(*Cd36*, *Sr-b1*, *Npc1l1*, *Abc1*)과 소장세포에서 카일로마이크론의 합성에 관여하는 *Mttp* mRNA 수준을 측정하였다 (Figure 3-3, 3-4).

공장에서의 콜레스테롤 수송체들 중 *Abc1* mRNA 수준은 전반적으로 CON군에 비해 HFD군에서 유의적으로 높았으며, *Cd36* mRNA 수준은 CON군에 비해 HFD군에서 높은 경향성을 보였다 ($P = 0.087$). 반면 *Sr-b1* mRNA 수준은 CON군이 HFD군에 비해 높았다 ($P < 0.001$). 공장에서의 *Mttp*의 mRNA 수준은 전반적으로 HFD군이 CON군에 비해 27.5% 높았다 ($P < 0.001$). 식이로 섭취한 비타민 D의 양은 소장에서 비타민 D 흡수에 관여하는 유전자의 발현에 영향을 미치지 않았다.



<P value>				
Fat amount	0.083	0.000	0.384	0.018
Vitamin D content	0.982	0.736	0.466	0.575
Interaction	0.738	0.550	0.468	0.845

Figure 3-3. The mRNA levels of genes involved in vitamin D absorption in jejunum.

Data are presented as mean \pm SEM, n = 6~8 for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D amounts, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; LVd: Low vitamin D; CVd: Control vitamin D; HVd: High vitamin D, *Cd36*, cluster of differentiation 36; *Sr-b1*, Scavenger receptor class B type1; *Npc1l1*, Niemann-Pick C1-Like 1; *Abca1*, ATP-binding cassette transporter A1

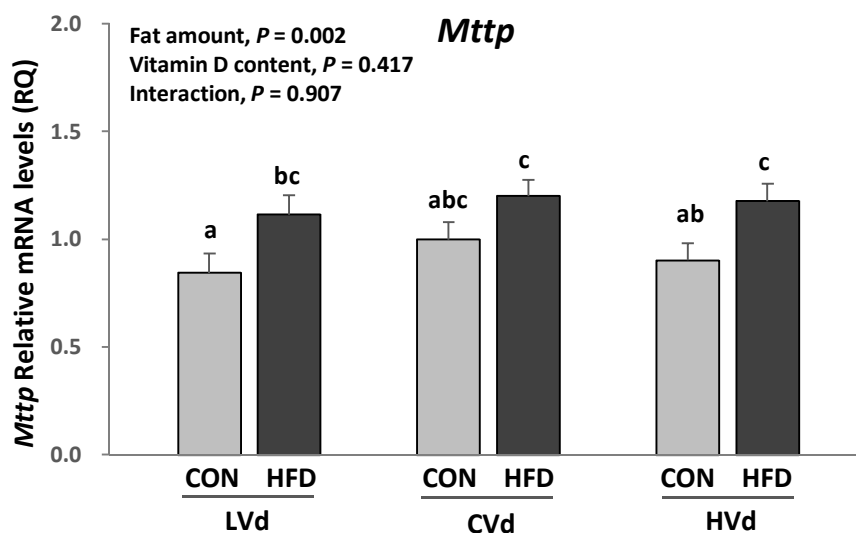
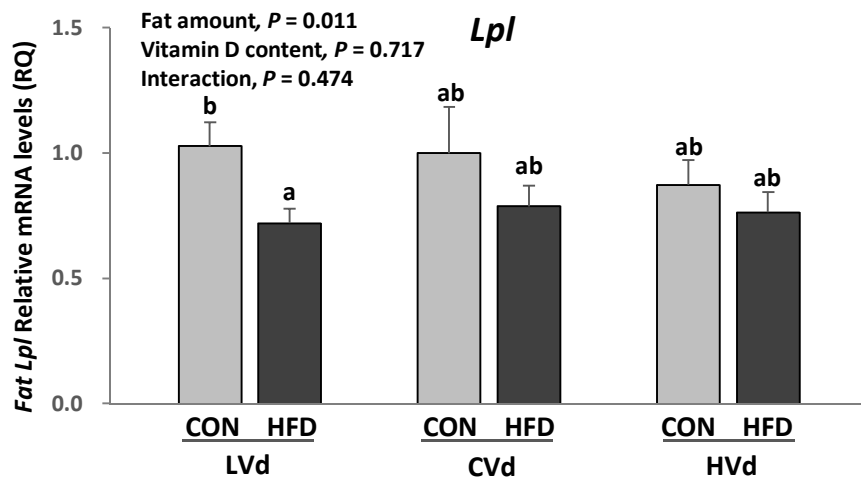


Figure 3-4. The mRNA levels of *Mttp* in jejunum

Data are presented as mean \pm SEM, $n = 6\sim 8$ for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; LVd: Low vitamin D; CVd: Control vitamin D; HVd: High vitamin D; *Mttp*, Microsomal triglyceride transfer protein.

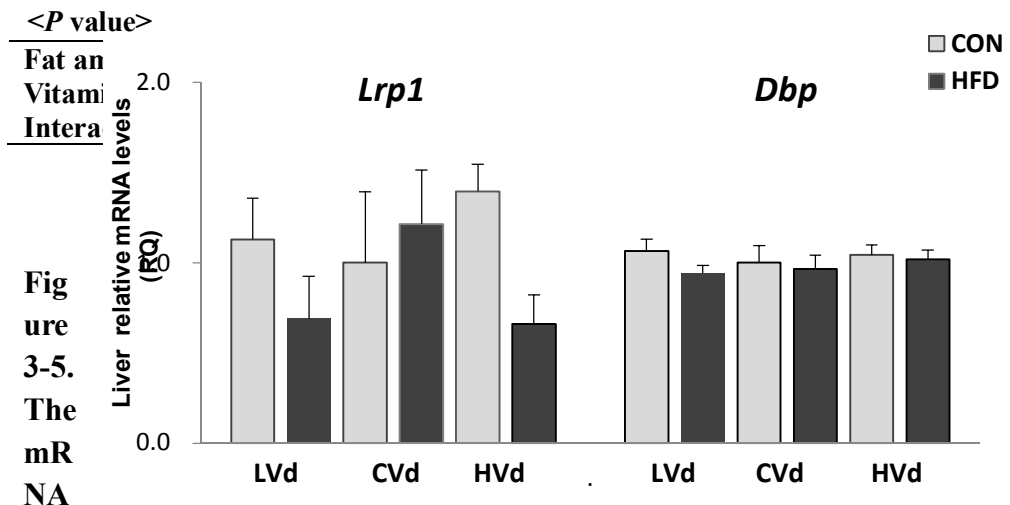
3.3.4. 소장을 통해 흡수된 비타민 D의 이동과 관계된 유전자의 발현량

LPL은 카일로마이크론의 중성지방을 분해하며, 형성된 카일로마이크론 램네프트는 간의 수용체인 LRP1과 결합한다. 그 과정에서 분해된 비타민 D는 DBP와 결합하여 혈액에 존재한다. 부고환지방의 *Lpl* mRNA 수준은 전반적으로 CON군에 비하여 HFD군에서 유의적으로 낮았으며 비타민 D의 섭취 정도에는 영향을 받지 않았다 (Figure 3-5). 간에서의 *Lrp1*과 *Dbp* mRNA 수준은 군간에 유의적인 차이를 보이지 않았다.



A)

B)



levels of genes involved in vitamin D transport in A) epididymal adipose

tissue and B) liver

Data are presented as mean \pm SEM, n = 6 for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; LVd: Low vitamin D; CVd: Control vitamin D; HVd: High vitamin D; *Lpl*, lipoprotein lipase; *Lrp1*, Low density lipoprotein receptor-related protein 1 ; *Dbp*, vitamin D binding protein;

3.3.5. 간과 지방조직에서의 비타민 D3와 25(OH)D3 농도 및 함량

3.3.5.1. 분석기기의 최적화 및 방법의 유효성 검증

PTAD로 유도체화된 물질들 (비타민 D3, d3-비타민 D3, 25(OH)D3, d3-25(OH)D3)을 검출하기 위하여 full scan analysis를 수행하였고, 네 가지 물질 모두 양성자로 이온화된 $[M+H]^+$ 을 ESI positive mode에서 측정하였다. PTAD로 유도체화 시킨 비타민 D3와 d3-vitamin D3의 m/z는 591와 594이며, 25(OH)D3와 d3-비타민 D3의 m/z는 607과 610이다. 각 물질들의 분리된 크로마토그래프 피크를 **Figure 3-6**에 제시하였다. 이온화된 물질들을 precursor ion으로 선택하였으며, 다양한 collision energy(CE) 아래에서 product ion scan을 수행하였다. 민감도와 분리 정도를 고려하여 각각 두 가지의 최적화된 product ion을 선택하였으며 정성과 정량 분석에 사용하였다. 머무름 시간 (retention time, tR)과 product ion에 대한 정보는 **Table 3-6**에 제시하였다.

Matrix matched 표준물질을 사용하였으며, 비타민 D3와 25(OH)D3의 정량한계 (LOQ)는 각각의 물질에 해당하는 피크의 신호 대 잡음비를 $(S/N) \geq 10$ 를 기준으로 하여 측정하였으며, 간과 지방조직의 LOQ 값은 각각 1 ng/mL이다. 검량선의 직선성 검증을 위해 상관계수 (r^2) 를 측정하였고, 간과 지방조직에서의 검량선은 모두 $r^2 \geq 0.990$ 으로 직선성이 검증되었으며, 측정한 네 가지 물질의 직선 범위는 1-1,000 ng/mL 이다.

정확도는 세가지 첨가한 농도 (1.5, 7.5, 혹은 75 ng/ g tissue)에서 수행하였으며, 비타민 D3의 경우 정확도가 간에서 96~107%, 지방조직에서 96~103% 이었으며, 25(OH)D3은 정확도 값이 간에서 87~104%, 지방조직에서 97~107%의 범위에 속했다 (**Table 3-7**). 정밀도는 **Table 3-8**에 자세하게 기술하였으며, 일 내 %CV 값은 간과 지방조직에서 비타민 D3와 25(OH)D3 모두 15% 미만이었으며, 일 간 % CV 값은 모두 16% 미만으로 이는 본 분석방법의 반복성이 적합하다는 것을 의미한다.

Table 3-6. MRM transition and collision energies (CE)

Name	t _R (min)	Mono isotopic Mass	MRM transition
			precursor ion > product ion (CE, V)
			Qualifier
Vitamin D3-PTAD	14.05	591.4	591.4 > 298.1
d3-Vitamin D3-PTAD	13.99	594.4	594.3 > 301.1
25-hydroxyvitamin D3-PTAD	7.48	607.4	607.4 > 298.1
d3-25-hydroxyvitamin D3-PTAD	7.44	610.4	610.4 > 301.1

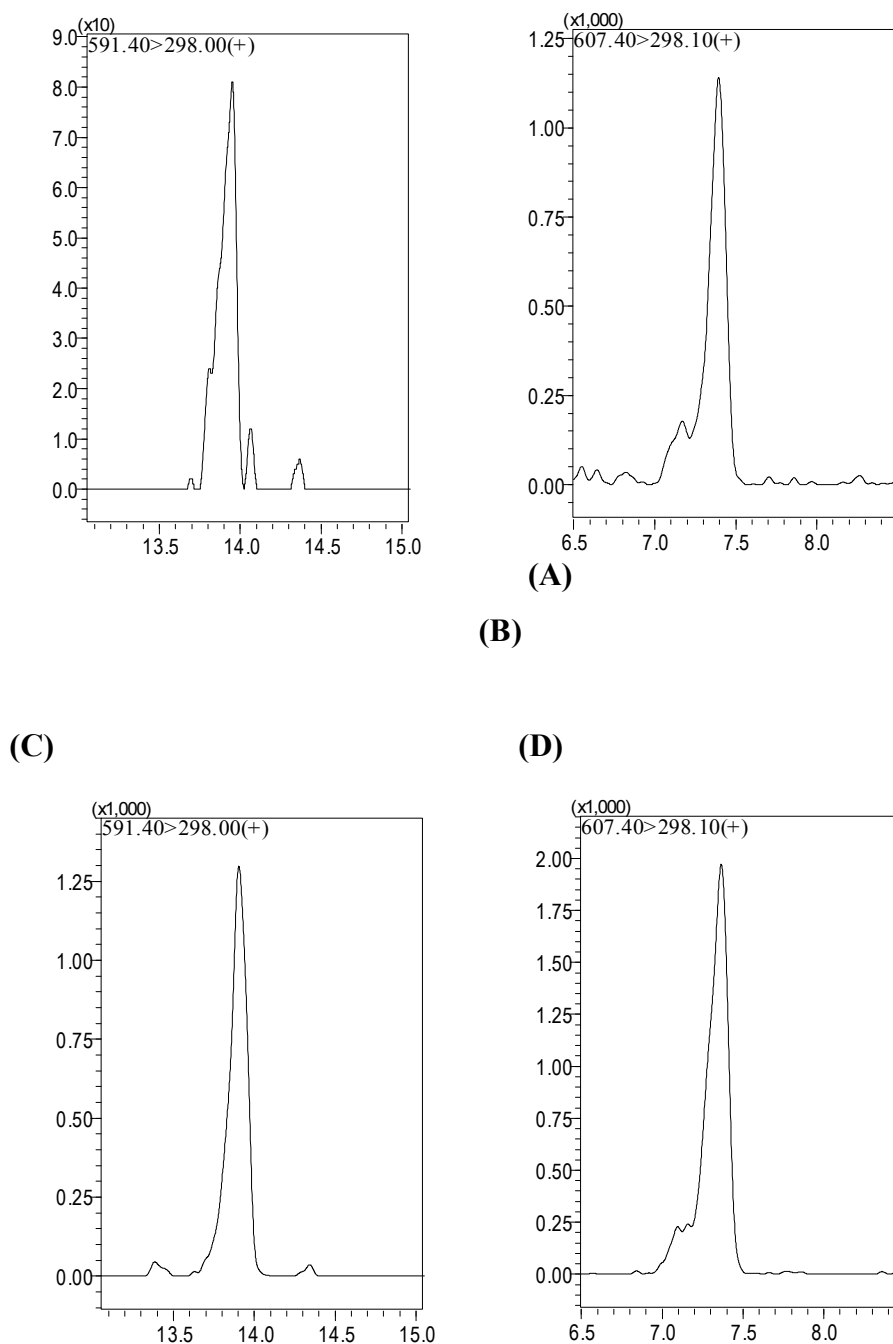


Figure 3-6. Chromatographic separation for each mass transition

(A) vitamin D3 in liver (B) 25-hydroxyvitamin D3 in liver (C) vitamin D3 in adipose tissue (D) 25-hydroxyvitamin D3 in adipose tissue.

Quality control samples were spiked with 1 ng/mL of vitamin D3 or 25-

hydroxyvitamin D3.

Table 3-7. Accuracy of vitamin D3 and 25(OH)D3 measurements in adipose tissue and liver. ¹

	Matrix	Spiked level ² ng/ g tissue (or ng/ mL)	Accuracy (%)
Vitamin D3	Liver	1.5 (2)	106.42
		7.5 (10)	96.42
		75 (100)	103.26
	Adipose tissue	1.5 (2)	96.8
		7.5 (10)	102.03
		75 (100)	94.84
25-hydroxyvitamin D3	Liver	1.5 (2)	103.6
		7.5 (10)	87.75
		75 (100)	99.86
	Adipose tissue	1.5 (2)	106
		7.5 (10)	106.34
		75 (100)	97.25

¹Accuracy was repeated on three days by the following equation: (mean of measured value/ QC sample value) x 100%.

²Spike levels were shown both as [ng/g tissue] when extracting 400mg of a 33% w/w tissue homogenate and [ng/ mL] for final concentration of vitamin D3 and 25(OH)D3 standards in reconstituted AcN.

Table 3-8. Within day (n=3) and between day (n=3) precision of vitamin D3 and 25(OH)D3 measurements from adipose tissue and liver. ¹

	Matrix	Spiked level ² ng/ g tissue (or ng/ mL)	Within day precision (n =3, %CV)	Between day precision (n =3, %CV)
Vitamin D3	Liver	1.5 (2)	3.78	15.17
		7.5 (10)	2.12	1.63
		75 (100)	0.31	6.28
	Adipose tissue	1.5 (2)	14.64	7.40
		7.5 (10)	7.37	6.46
		75 (100)	2.04	2.23
25-hydroxyvitamin D3	Liver	1.5 (2)	5.91	4.39
		7.5 (10)	3.28	6.19
		75 (100)	2.77	8.27
	Adipose tissue	15 (10)	4.32	4.29
		75 (50)	8.22	0.91
		375 (250)	5.17	1.76

¹Precision was determined as relative coefficient of variation (%CV): (standard deviation / mean) × 100%.

The analyses were done on three different days.

²Spike levels were shown both as [ng/g tissue] when extracting 400mg of a 33% w/w tissue homogenate and [ng/ mL] for final concentration of vitamin D3 and 25(OH)D3 standards in reconstituted AcN.

3.3.5.2. 간과 지방조직에 저장된 비타민 D₃의 농도 및 함량

간과 부고환 지방조직에서의 비타민 D₃ 농도는 전반적으로 비타민 D 보충에 의해 높은 값을 보였다 ($P < 0.001$). HVd군 마우스의 간 조직의 비타민 D₃ 농도는 719.1 ng/ g tissue로 CVd군의 값 (12.8 ng/g tissue)에 비해 55 배 높았으며, 지방조직의 비타민 D₃ 농도는 HVd군(317.5 ng/g)이 CVd군 (3.1 ng/g)보다 100배 정도 높았다. 하지만 고지방식이의 섭취여부는 간과 지방조직의 비타민 D₃ 농도에 유의적인 영향을 주지 않았다 (Table 3-9).

각 조직의 양을 곱하여 간과 부고환 지방조직에 저장된 비타민 D₃의 함량을 계산하였다. 간과 지방조직의 비타민 D₃ 함량은 모두 비타민 D 섭취에 의한 영향은 물론 ($P < 0.001$) 고지방식이와 ($P < 0.01$) 비타민 D 섭취와 고지방식이의 교호작용의 영향 ($P < 0.01$)을 받았다. 식이 kg당 1,000 IU의 비타민 D를 섭취한 CVd군에서는 고지방식이 섭취가 간과 지방조직 내 비타민 D₃ 함량에 영향을 미치지 않은 반면, 식이 kg당 25,000 IU의 비타민 D를 보충한 HVd군에서는 고지방식이를 섭취한 HFD군의 간과 지방조직의 비타민 D₃ 함량이 CON군에 비해 유의적으로 높았다. HFD_HVd군의 비타민 D 함량은 CON_HVd군의 값에 비해 간은 121%, 부고환 지방조직은 44% 높았다.

Table 3-9. Vitamin D3 levels and amount in liver and epididymal fat tissue^{1,2}

		CVd		HVD		P-value		
		CON (n=7)	HFD (n=7)	CON (n=7)	HFD (n=7)	Fat amount	Vitamin D content	Interaction
Liver	Vitamin D3 levels (ng/ g tissue)	14.53 ±3.0 ^a	11.09 ±2.9 ^a	628.3 ±74.7 ^b	797.0 ±105.3 ^b	0.210	< 0.001	0.192
	Vitamin D3 amounts (ng)	16.73 ±3.16 ^a	24.47 ±5.70 ^a	727.1±108.9 ^b	1608.0 ±207.6 ^c	0.001	< 0.001	0.001
Epididymal Fat	Vitamin D3 levels (ng/ g tissue)	3.80 ±0.44 ^a	2.50 ±0.50 ^a	327.4 ±61.57 ^b	310.5 ±28.95 ^b	0.768	< 0.001	0.806
	Vitamin D3 amounts (ng)	4.68 ±0.54 ^a	3.87 ±0.71 ^a	385.4± 45.1 ^b	554.3 ±23.3 ^c	0.002	< 0.001	0.002

¹Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. Data are presented as mean ± SEM.

²CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; CVd:Control vitamin D; HVD: High vitamin D.

3.3.5.3. 간과 지방조직에 저장된 25(OH)D₃의 농도 및 함량

간과 지방조직의 25(OH)D₃ 농도도 비타민 D₃ 농도와 마찬가지로 전반적으로 비타민 D 보충군에서 높았다 ($P < 0.001$) (**Table 3-10**). 평균적으로 HVd군의 25(OH)D₃ 농도는 간: 33.9 ng/g, 지방: 18.9 ng/g로써 CVd군의 값 (간: 7.9 ng/g, 지방: 5.6 ng/g)에 비해 간은 3.3배, 부고환 지방조직은 2.4배 높았다. 간의 25(OH)D₃ 농도는 고지방식이와 고지방식이와 비타민 D 섭취에 의한 교호작용에 의한 영향을 받았는데, CVd군의 경우 CON군과 HFD군 사이에 25(OH)D₃ 농도의 유의적인 차이가 없었던 반면, 비타민 D를 보충한 HVd군의 경우 HFD군의 25(OH)D₃ 농도가 CON군의 값보다 낮았다 ($P < 0.001$). 이는 혈액의 25(OH)D 농도와 비슷한 양상이며, 실제 간의 25(OH)D₃ 농도는 혈청 25(OH)D 농도와 매우 유의적인 상관관계를 보였다 (**Figure 3-7**). 지방조직의 25(OH)D₃ 농도는 고지방식이 섭취에 의한 영향은 받지 않았다.

간의 25(OH)D₃의 함량(ng)은 고지방식이 섭취에 의한 유의적인 차이가 없었으나, 지방조직의 경우 CVd와 HVd군 모두 고지방식이 섭취에 의해 25(OH)D₃ 함량(ng)이 상승했다 ($P < 0.001$).

Table 3-10. 25-hydroxyvitamin D3 levels and amount in liver and epididymal fat tissue^{1,2}

		CVd		HVd		P-value		
		CON (n=7)	HFD (n=7)	CON (n=7)	HFD (n=7)	Fat amount	Vitamin D content	Interaction
Liver	25(OH)D3 levels (ng/ g tissue)	7.47 ±0.43 ^a	8.24 ±0.67 ^a	41.9 ±3.5 ^c	27.0 ±3.0 ^b	0.004	< 0.001	0.002
	25(OH)D3 amounts (ng)	8.65 ±0.88 ^a	18.94 ±1.82 ^a	47.8±4.3 ^b	53.5 ±6.2 ^b	0.052	< 0.001	0.552
Epididymal Fat	25(OH)D3 levels (ng/ g tissue)	3.43 ±0.43 ^a	8.03 ±1.52 ^a	18.1±2.2 ^b	19.5 ±2.1 ^b	0.089	< 0.001	0.364
	25(OH)D3 amounts (ng)	4.41 ±0.77 ^a	12.5 ±2.1 ^b	22.4± 3.0 ^c	35.9 ±3.9 ^d	0.001	< 0.001	0.334

¹Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. Data are presented as mean ± SEM.

²CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; CVd:Control vitamin D; HVd: High vitamin D.

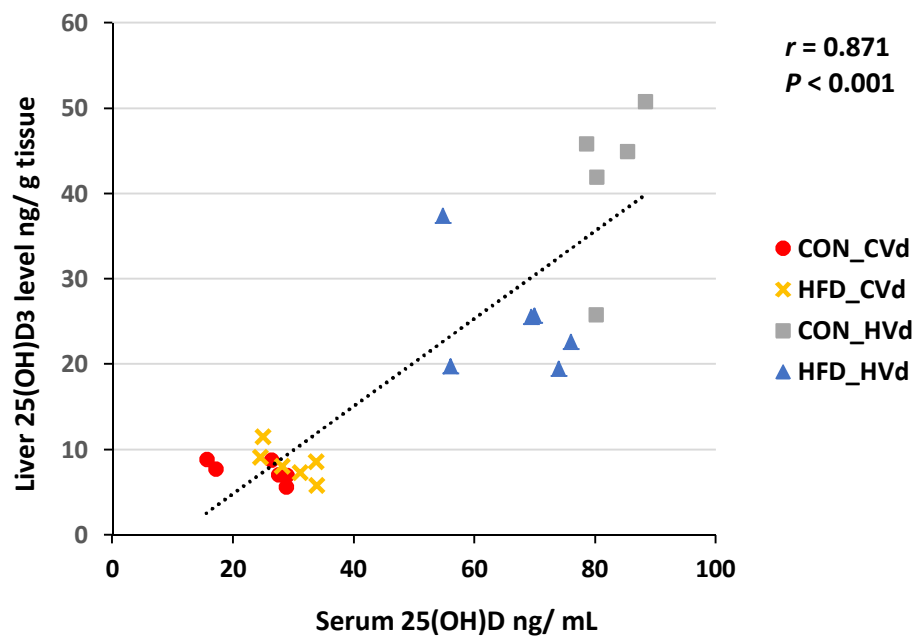


Figure 3-7. Correlation between liver 25(OH)D3 levels and serum 25(OH)D levels

n = 28, Pearson correlation coefficient, r , and P value are indicated.

3.3.6. 간과 지방조직의 25-hydroxylase 발현량

간은 체내 조직 중 25-hydroxylase를 다량 함유하고 있어 비타민 D를 25(OH)D로 25-hydroxylation시키는 주요 기관이다. 간에서의 *Cyp2r1*과 *Cyp27a1* mRNA 발현수준은 고지방식이 혹은 비타민 D 섭취 정도에 따른 영향을 받지 않았다 (**Figure 3-8A**). 부고환 지방조직에서의 25-hydroxylase는 각각 고지방식이 섭취에 따라 다른 영향을 받았는데, *Cyp2r1*은 고지방식이 섭취에 의해 유의적으로 높은 발현을 보인 반면, *Cyp27a1* mRNA 수준은 전반적으로 CON군에 비해 HFD군에서 낮았다(**Figure 3-8B**).

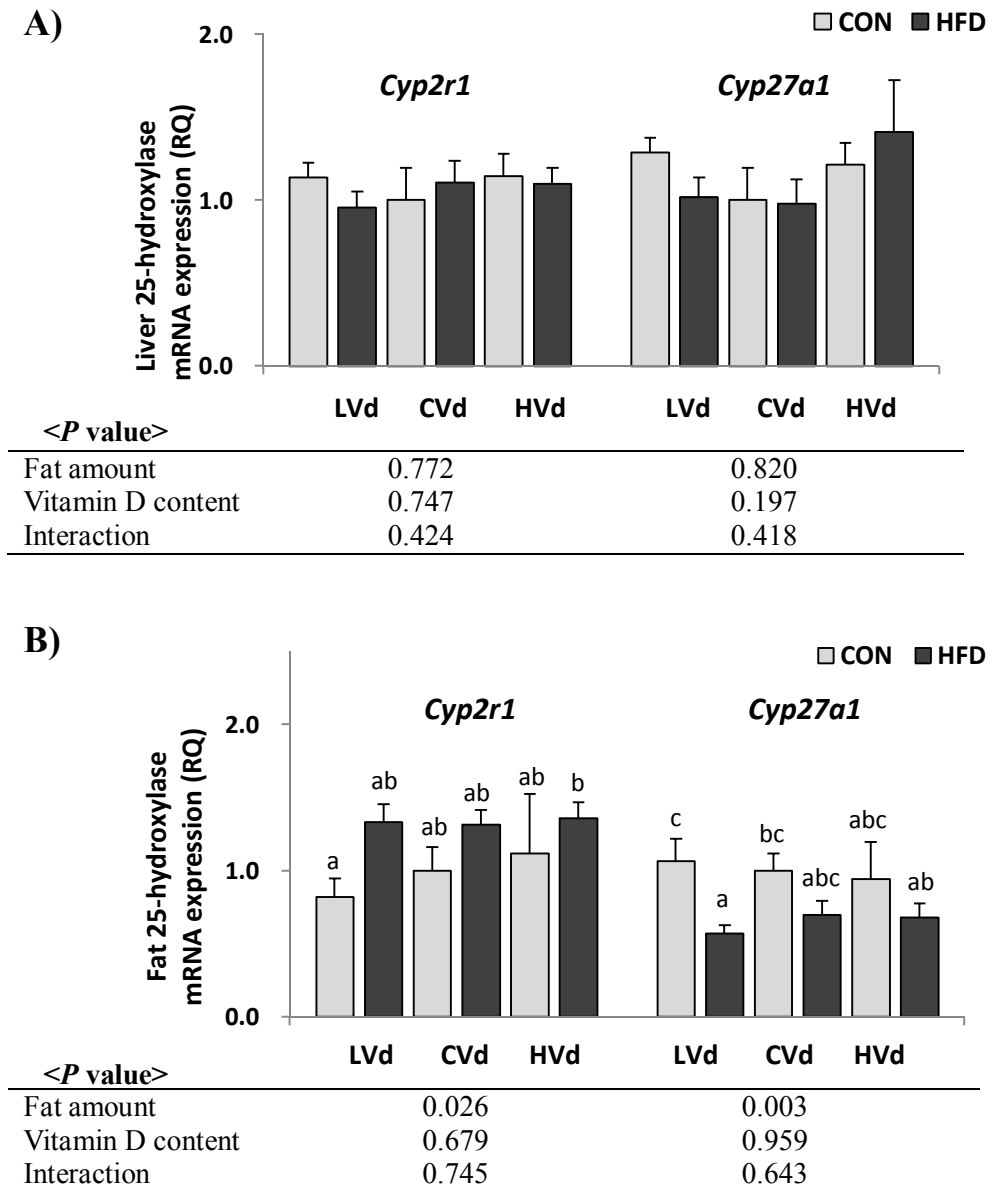


Figure 3-8. The mRNA levels of 25-hydroxylases in (A)liver and (B)epididymal fat tissue

Data are presented as mean \pm SEM, $n = 6$ for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; LVd: Low vitamin D group; CVd: Control vitamin D group; HVd: High vitamin D group. *Cyp2r1*, cytochrome P450 2R1; *Cyp27a1*, cytochrome P450 27A1.

3.4. 고찰

본 연구에서는 고지방식이로 유도한 비만이 혈액의 25(OH)D 농도와 비타민 D 대사에 영향을 주며, 비타민 D를 섭취한 정도에 따라 비만이 비타민 D의 흡수 및 저장에 차별적인 영향을 미치는 것을 확인하였다. 비타민 D 섭취가 부족하거나 충분할 때, 식이로 유도된 비만이 섭취한 비타민 D의 대사, 즉 소장에서 흡수되고 조직에 저장되며 간에서 hydroxylation되어 혈액의 25(OH)D가 되는 일련의 과정에 미치는 영향을 연구하였다. 비만에서 보고된 혈중 25(OH)D의 변화 기전이, 증가한 지방조직에 비타민 D가 저장되기 때문이라는 가설이 유력함에도 불구하고, 비타민 D의 섭취 정도와 합성의 환경을 통제한 뒤, 비만이 조직에 저장되는 비타민 D에 미치는 영향을 확인한 선행연구가 거의 없다. 따라서 본 연구에서는 일정한 환경에서 UVB에 노출되는 시간을 제한하고 피부에서 합성되는 비타민 D를 통제하였으며, 비타민 D와 지방의 양을 달리한 실험식이를 13주간 급여한 이후 비만 마우스와 대조 마우스의 조직 속 비타민 D의 농도를 측정하고 비교하는 것을 중점적으로 탐색하였다.

혈청 25(OH)D는 반감기가 15일 정도로 긴 편이며 섭취한 비타민 D의 양을 잘 반영하므로 체내 비타민 D 상태를 평가하는 지표로 사용된다. 본 연구에서도 고지방식이 섭취 유무와 관계없이 비타민 D 섭취 정도에 혈청 25(OH)D 농도가 비례하였다 ($r = 0.932, P < 0.001$). 식이 kg 당 50 IU의 비타민 D₃를 제공한 LVd군에서는 식이 kg당 1,000 IU의 비타민 D₃를 섭취한 CVd군에 비해 혈청 25(OH)D 농도가 59% 정도 낮았고, 25,000 IU의 비타민 D₃/ kg diet를 섭취한 HVd군에서는 혈청 25(OH)D의 농도가 180% 정도 높은 것을 확인할 수 있었다. 이는 다수의 선행연구에서 혈청 25(OH)D가 섭취한 비타민 D의 양에 비례한다고 한 것과 일치하는 결과이다(Barger-Lux *et al.* 1998).

조직의 비타민 D₃ 및 25(OH)D₃ 농도를 통해서도 섭취한 비타민

D에 비례하여 조직의 비타민 D 농도가 증가하는 결과를 확인할 수 있었는데, 선행연구에서도 섭취한 비타민 D 양에 따라 조직의 비타민 D 및 25(OH)D 수준이 증가한다고 보고된 바 있다(Lipkie *et al.* 2013, Burild *et al.* 2016). HVd군의 간과 부고환 지방조직의 비타민 D₃ 농도는 각각 719.1와 317.5 ng/g tissue로 CVd군 (간: 12.8 ng/g, 지방: 3.1 ng/g)보다 각각 55배, 100배 높았다. 이는 비타민 D 보충에 의한 혈액의 25(OH)D 상승에 비해 매우 높은 폭으로 증가한 셈이다. 간과 지방조직의 25(OH)D₃ 농도도 비타민 D 보충에 의해 증가하였는데, 농도는 비타민 D를 보충한 경우 간의 25(OH)D₃ 농도는 33.9 ng/g, 지방조직의 농도는 18.9 ng/g로써 비타민 D 대조군 (간: 7.9 ng/g, 지방: 5.6 ng/g)에 비해 간은 3.3배 지방조직의 농도는 2.4배 더 높았다. Lipkie 등(2013)의 연구에서는 식이 kg당 740 IU의 비타민 D₃를 8주간 섭취한 랫트의 간과 부고환 지방조직의 비타민 D 농도가 각각 3.9와 7.6 ng/g tissue, 25(OH)D 농도가 간과 지방조직이 모두 0.5~1 ng/g tissue라고 하였다. Jakobsen 등(2007)은 하루에 2,000 IU의 비타민 D₃를 섭취한 돼지의 비타민 D₃ 농도는 간: 2.7ng/g, 지방: 7 ng/g였으며, 25(OH)D 농도가 지방조직은 1.9 ng/g, 간은 4ng/g 이었다. 따라서 동물의 종류가 다르긴 하지만, 본 연구의 CVd군의 조직 내 비타민 D₃ 및 25(OH)D₃ 수준은 선행연구의 값과 비슷한 수준으로 여겨진다. 선행연구와 달리 지방조직에 비하여 간 조직의 비타민 D₃ 농도가 더 높았으나, 과거 동위원소가 표지된 비타민 D를 섭취한 결과 섭취 직후 간에서 가장 높은 방사능의 농도가 관측된 바 있으며(Mawer *et al.* 1972), 돼지에 식이 키로 당 50 µg의 비타민 D₃를 급여한 경우 지방조직 보다 간 조직의 평균 비타민 D₃ 농도가 더 높다고 보고되었다(Burild *et al.* 2016). 따라서 간이 비타민 D의 저장장소는 아니지만 비타민 D가 처음으로 hydroxylation되는 조직이므로 비타민 D 섭취 직후에 조직 내 농도가 높을 수 있을 것으로 사료된다.

혈청 25(OH)D 농도는 비타민 D 섭취에 의해 상승할 뿐 아니라, 식이에 포함된 비타민 D의 양이 동일한 경우엔, 고지방식으로 유도된

비만에 의해 값이 변화되는 것이 관찰되었다 (교호작용, $P < 0.001$). 비타민 D를 부족하게 급여하였을 때는(LVd군) 혈중 25(OH)D 농도가 CON군에 비해 HFD군에서 높았으나, 비타민 D 대조군(CVd군)에서는 차이가 없었고, 비타민 D를 보충했을 때는(HVd군) 오히려 CON군에 비해 HFD군의 혈청 25(OH)D 농도가 낮았다. 혈액의 25(OH)D를 생성하는 간에서의 25-hydroxylase 발현이 군간에 수준 차이가 없었으므로 혈청 25(OH)D 농도의 차이는 기질인 비타민 D 수준의 차이에서 비롯된 것으로 사료된다. 다수의 임상연구에서 비만한 사람의 혈청 25(OH)D 농도의 저하가 관찰된 바 있으며(Cheng *et al.* 2010, Mai *et al.* 2012), 그 원인은 비만에서 증가한 지방조직에 비타민 D가 저장되었기 때문으로 보고되었다(Drincic *et al.* 2012). 본 연구에서도 비타민 D를 보충한 군에서 비만에 의한 혈청 25(OH)D 농도 저하가 확인되었다. 사료에 들어있는 비타민 D의 양과, 하루에 섭취한 사료의 양을 고려하면, 하루에 섭취한 비타민 D의 양은 CON_HVd군의 경우 71.3 IU, HFD_HVd군의 경우 82.5 IU이다. HFD_HVd군이 CON_HVd군에 비해 16% 더 많은 비타민 D를 섭취하였음에도 불구하고 혈액의 25(OH)D 농도가 낮은 것을 확인할 수 있다. 이는 HFD군의 간과 지방조직에 저장된 높은 비타민 D₃의 함량(ng)이 CON군에 비해 상대적으로 낮은 혈청 25(OH)D 수준에 기여했을 것으로 생각된다. 비타민 D를 보충한 HFD군의 간과 부고환 지방조직의 비타민 D₃ 함량은 각각 1,608 ng와 554 ng으로 CON군의 함량(간: 727 ng, 지방: 385 ng)에 비해 간은 121%, 지방조직은 44% 더 높다. 부고환 지방조직과 피하지방조직의 비타민 D₃ 농도가 같다고 가정하기 어려우나, 부고환 지방조직의 비타민 D₃ 농도에 DEXA로 측정한 총 체지방량(g)을 곱하여 총 지방조직의 비타민 D₃ 농도를 추정할 경우, 비타민 D를 보충한 HFD군의 총 지방조직의 비타민 D₃ 함량은 8,187 ng으로 CON군 (2,799 ng)에 비해 192% 더 높다.

비록 간과 부고환 지방조직의 비타민 D₃ 농도는 비타민 D를 보충한 CON군과 HFD군 사이에 유의적인 차이가 없었다. 하지만 비타민 D

대조군에서는 조직의 비타민 D3 농도(ng/ g tissue)뿐 아니라 조직의 양을 고려한 비타민 D3의 함량(ng)도 비만에 의한 차이가 없었던 반면, 비타민 D 보충군에서는 간과 지방조직의 비타민 D3의 함량이 모두 HFD군에서 높았다. 이는 섭취하는 비타민 D의 양에 따라 조직에 저장되는 비율에 차이가 있음을 시사한다. 선행연구에서도 적당한 비타민 D를 섭취할 때보다, 많은 양의 비타민 D를 섭취할 경우 비타민 D가 25(OH)D로 hydroxylation되기 보다는 비타민 D3 형태로 지방조직에 저장되어 서서히 25(OH)D로 전환된다고 보고된 바 있다(Heaney *et al.* 2008). Wortsman 등(2000)의 연구에서도 비만한 사람과 그렇지 않은 사람에게 고용량의 비타민 D (50,000 IU)를 섭취시킨 결과 25시간 뒤의 혈청 25(OH)D 농도가 비만한 사람에게서 유의적으로 낮음을 확인하였으며 이는 비타민 D3가 지방조직에 격리되었기 때문이라고 설명하였다. 이는 비타민 D를 보충한 경우 지방조직에 비타민 D3가 저장되기 때문에 비만한 사람의 혈청 25(OH)D가 대조군에 비해 낮다는 점에서 본 연구와 일치한다. 하지만 동일한 비타민 D를 섭취하였을 때, 간과 지방조직의 비타민 D3 농도가 HFD군과 CON군 사이에 차이가 없다는 점에서, 보충한 비타민 D3가 지방조직에 높은 농도로 격리된다고 보다는, 비만으로 인해 증가한 지방조직에 총 비타민 D가 희석되는 것으로 사료된다. 다만 지방조직과 혈액에 비타민 D가 분배되는 정도는 섭취한 비타민 D의 양에 따라 다를 가능성이 있다.

비타민 D를 보충했을 때와는 달리, 비타민 D를 부족하게 섭취한 LVd군에서는 CON군의 혈청 25(OH)D 농도가 7.8 ng/mL로 HFD의 농도 (13.9 ng/mL)에 비해 낮은 경향성을 보였다 ($P = 0.054$). HFD_LVd군이 하루에 섭취한 비타민 D의 양은 평균 0.18 IU로 CON_LVd군의 섭취량인 0.15 IU보다 높았다. CON_LVd군에 비해 HFD_LVd군의 비타민 D 섭취량은 17% 높았던 반면, 혈청 25(OH)D 농도는 78.2% 높은 경향성을 보였으므로 HFD군의 높은 혈청 25(OH)D 농도는 섭취량 이외에도 다른 요인의 영향을 받았을 가능성이 존재한다. LVd군에서 측정된 간과

지방조직의 비타민 D₃ 및 25(OH)D₃ 농도는 본 연구 방법의 정량한계 (1 ng/mL) 미만으로 정량하지 못하였으나, 선행연구에서 16 IU 비타민 D₃ 혹은 49 IU 비타민 D₂/ kg diet를 8주간 급여한 랫트의 조직 농도 (비타민 D < 1 ng/g, 25(OH)D < 0.1 ng/g)가 매우 낮은 것을 고려하면(Lipkie *et al.* 2013), 조직에 저장된 비타민 D 농도가 혈액의 25(OH)D에 미치는 영향은 다소 적을 것으로 예측된다. 또한 Heaney 등(2008)의 연구에서도 간에서의 25-hydroxylase가 포화되지 않을 정도로 비타민 D를 적게 섭취할 경우에는, 비타민 D가 조직에 저장되기 보다는 혈중 25(OH)D로 빠르게 전환된다고 보고하였다. 이 연구에서 언급한 25-hydroxylase의 포화기준은 혈중 비타민 D 농도 15 nmol/L(5.8 ng/mL) 이하, 혈중 25(OH)D 농도 80 nmol/L(32 ng/mL) 이하를 의미하며 이는 본 연구에서의 LVd군의 혈중 25(OH)D 농도가 포함되는 범위이다. 따라서 LVd군의 경우 섭취한 비타민 D가 대부분 혈액의 25(OH)D로 전환되었을 가능성이 있다.

혈중 25(OH)D 농도는 섭취하는 비타민 D의 양, BMI, 지방조직의 양 이외에도 유전적 변이 및 비타민 D와 함께 섭취하는 지방의 양의 영향을 받는다고 알려져 있다(Dawson-Hughes *et al.* 2013). 비타민 D를 부족하게 제공한 경우 HFD군의 혈중 25(OH)D 농도가 CON군에 비해 높았던 이유는 HFD군의 경우 CON군에 비해 비타민 D가 소장에서 더 잘 흡수되었기 때문으로 사료된다. 첫 번째 근거로는 HFD군의 식이에 포함된 높은 지방량으로 인해 비타민 D의 흡수가 높아졌을 가능성을 들 수 있다. 소화관에 지방이 존재하는 경우 담즙산의 분비가 촉진되어 비타민 D의 흡수가 증진된다고 보고되었다(Hollander *et al.* 1978). 또한 비타민 D가 부족한 환자를 대상으로 비타민 D를 식사와 함께 보충하는 실험을 진행한 결과 동일하게 비타민 D를 섭취하더라도, 세끼 식사 중 가장 많은 양을 섭취하는 식사(대부분 저녁식사)와 함께 비타민 D를 복용하는 경우 비타민 D의 흡수가 증가하여 혈중 25(OH)D가 50% 정도 늘어난다고 보고되기도 하였다(Mulligan *et al.* 2010). Raimundo 등(2011)의

연구에서도, 혈중 25(OH)D 농도가 75 nmol/L 인 건강한 성인에게 2주간 비타민 D를 저지방 혹은 고지방과 함께 섭취시켰더니, 고지방과 비타민 D를 함께 섭취한 경우에만 유의적으로 혈중 25(OH)D가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 하지만 지방의 섭취와 비타민 D 흡수의 관련성이 확인되지 않은 연구도 있으며(Tangpricha *et al.* 2003), 지방의 섭취량에 비타민 D의 흡수가 비례하는 것은 아니기 때문에(Dawson-Hughes *et al.* 2013) 고지방식이 섭취가 HFD군의 비타민 D 섭취를 증가시켰는지에 대해서는 더 연구가 필요하다.

비타민 D를 부족하게 섭취한 경우 HFD군의 비타민 D 흡수가 CON군에 비해 증가하였다고 추론한 두 번째 근거로는 소장에서 비타민 D 흡수와 관계된 몇가지 지표의 발현이 HFD군에서 높았던 점을 꼽을 수 있다. 식이로 섭취한 비타민 D는 소장에서 다른 지방성분들과 카일로마이크론을 형성하여 흡수된다고 알려진 바 있다. 소장 상부의 *Mttp*는 카일로마이크론의 형성에 필수적이며, 소장에서의 지질의 흡수 증진에 기여한다고 유전자로써, 공장의 *Mttp* mRNA 발현량은 고지방식이 섭취군에서 유의적으로 높았으며, 특히 HFD_LVd군의 발현이 CON_LVd군에 비해 32% 정도 높았다. 뿐만 아니라 최근 비타민 D가 수동확산을 통해 소장세포로 들어올 뿐 아니라 콜레스테롤 수송체를 통해 능동수송 된다고도 보고되었는데(Reboul *et al.* 2011, Reboul 2015), 이와 관련된 지표들 중 *Abca1*의 발현이 CON군에 비해 HFD군의 공장에서 높았으며, *Cd36*의 발현은 높은 경향성을 보였다. 선행연구에서도 고지방식으로 비만을 유도한 동물의 소장에서 *Mttp*와 *Cd36* 수준이 높아진다고 보고된 바 있으므로(Lin *et al.* 1994, Zhu *et al.* 2016), 고지방식으로 유도된 비만이 소장에서 비타민 D 흡수와 관계된 유전자의 증진을 야기하여 비타민 D의 흡수 증가에 일부 기여하였을 가능성이 있다 하지만 *Mttp*의 발현은 포화지방산의 섭취나 콜레스테롤의 섭취를 통해 증가한다고 보고되기도 하였으므로(Hussain *et al.* 2011), 고지방식이에 포함된 포화지방산이나 콜레스테롤이 *Mttp* 발현을

상승시켰을 가능성도 존재한다. 공장의 *Sr-b1* 발현은 다른 지표들과는 달리 HFD군에서 유의적으로 낮았는데, *Sr-b1*이 비타민 D가 소장세포로 유입(influx)되거나 유출(efflux)되는 모든 과정에 관여하므로(Reboul 2015), 이 유전자의 낮은 발현이 비타민 D의 흡수를 낮춘다고 보기는 어려우나 이와 관련해서는 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

CVd군에서는 CON군과 HFD군 사이에 혈청 25(OH)D 농도 및 간과 지방조직의 비타민 D 수준의 차이가 없었다. 다른 선행 연구에서도 AIN 76에 기반한 식이를 섭취한 대조 마우스에서는 식이로 유도된 비만군과 대조군 사이에 혈중 25(OH)D 농도 차이가 관찰되지 않았다(Park *et al.* 2015, Jung *et al.* 2018). 비록 다수의 임상연구에서 비만에 의해 혈청 25(OH)D 농도가 저하된다고 보고되었으나, 햇빛에 의한 비타민 D 합성이 통제되지 못하였으며, 섭취하는 비타민 D의 양 모두 다르므로 비만이 혈중 25(OH)D에 독립적으로 미치는 영향을 파악하기는 어려울 것으로 생각된다.

결론적으로 본 연구에서는 비만마우스에서 혈액 25(OH)D, 그리고 간과 지방조직의 비타민 D와 25(OH)D 농도를 측정함으로써, 비타민 D 섭취 수준에 따른 비만의 영향을 확인하였다. 혈중 25(OH)D는 섭취한 비타민 D의 양에 비례하여 증가하며, 섭취한 비타민 D의 양이 동일할 때에는 식이 중 비타민 D3 함량에 따라 고지방식은 25(OH)D 농도에 각기 다른 영향을 주었다. 비타민 D를 보충섭취 하였을 때는 대부분이 간과 지방조직에 비타민 D3의 형태로 저장되므로, 비만마우스의 간과 지방조직 내 비타민 D3 함량이 대조마우스에 비해 높았으며 혈액의 25(OH)D 농도는 대조 마우스에 비해 낮았다. 반면 비타민 D를 부족하게 섭취하였을 때는 비만마우스의 조직에 저장되는 비타민 D의 양은 매우 적기 때문에 (1ng/ g 미만) 이것이 혈액 25(OH)D에 미치는 영향은 적을 것으로 예상된다. 하지만 지용성의 비타민 D가 지방과 섭취할 경우 흡수가 증가되었을 가능성이 있으며, 고지방식으로 유도된 비만이 소장에서의 비타민 D 흡수와 관계된 유전자의 발현 수준을

상승시켰는데, 이러한 영향이 비타민 D를 부족하게 섭취한 비만 마우스의 혈액의 25(OH)D 농도 상승에 기여하였을 가능성이 존재한다.

제 4 장 비만마우스에서 비타민 D 보충이 1,25(OH)₂D의 대사 및 지방조직의 염증지표에 미치는 영향

4.1. 서론

비만은 비타민 D의 대사에 영향을 미친다. 비만한 경우 비타민 D 결핍과 부족의 비율이 증가한다고 보고되었고(Pereira-Santos *et al.* 2015), 이러한 비타민 D 부족은 비만이 야기한 경정도의 만성적인 염증반응을 심화시켜 대사성 질환을 야기한다고도 알려졌다(Garcia *et al.* 2009, Mezza *et al.* 2012, Roth *et al.* 2012). 또한 비만은 혈액의 1,25(OH)₂D의 항상성 조절 기전을 변화시킨다고도 알려졌다. 일반적으로 체내의 비타민 D 상태를 나타내는 지표로 혈액의 25(OH)D 값이 사용되지만 실제 비타민 D의 기능인 칼슘과 인 대사와 지방조직의 염증반응에 기여하는 비타민 D의 형태는 1,25(OH)₂D 이다(Alshahrani *et al.* 2013).

혈액에 존재하는 25(OH)D의 반감기가 2주 정도로 길고, 피부에서 합성되거나 식이로 섭취한 비타민 D가 혈액의 25(OH)D 농도에 잘 반영되는 것과는 달리 25(OH)D가 hydroxylation된 형태인 혈액의 1,25(OH)₂D 농도는 반감기가 15시간으로 짧고 항상성 유지가 매우 잘 되기 때문에 비타민 D를 섭취하더라도 혈액의 농도가 크게 변화하지 않는 특징을 갖는다(Jones *et al.* 1998, Fleet *et al.* 2008). 하지만 혈액의 1,25(OH)₂D 수치도 임상적으로 중요한 의미를 갖는데, 만성 콩팥병 환자에게서 혈중 1,25(OH)₂D 농도 저하가 관측되며 뼈의 골연화증이 동반되기도 하므로 1,25(OH)₂D의 농도는 신장의 건강상태를 알려주는 지표가 되기도 한다(Del Valle *et al.* 2011). 그 외에도 낮은 혈액의 1,25(OH)₂D 수치는 당뇨, 심장병 등과 관계가 있다고 보고되며, 심장병을 가진 환자들의 중기 사망률과도 관계가 있다고 알려졌다(Zittermann *et al.* 2009). 또한 비만한 경우 혈중 1,25(OH)₂D 농도의 비정상적인 조절이

관측되기도 하였는데 비만이 혈중 1,25(OH)₂D 농도를 감소시킨다고 보고되기도 하고(Camozzi *et al.* 2016), 증가시킨다고 보고되기도 하였다(Bell *et al.* 1985, Grethen *et al.* 2011, Park *et al.* 2015). Camozzi 등(2016)은 비타민 D 복용 직후 비만한 사람에서 1,25(OH)₂D 수치 저하를 관측하였으며, Bell 등(1985)은 비타민 D를 추가적으로 복용하지 않은 상태에서, 비만한 사람의 1,25(OH)₂D 수준이 높음을 확인하였다. 따라서 혈중 1,25(OH)₂D 농도가 빠르게 조절되는 지표임을 고려할 때 비타민 D 섭취여부와 그 정도에 따라 비만이 혈액의 1,25(OH)₂D에 미치는 영향이 변화할 가능성이 존재한다. 게다가 비만에 의한 1,25(OH)₂D의 상승을 관찰한 연구들 중에서도, 혈청 25(OH)D의 저하가 동반되기도 하고 그렇지 않기도 하였으므로 그 기전에 대해서는 더 연구가 필요한 실정이다(Park *et al.* 2015, Jung *et al.* 2018).

CYP27B1은 주로 신장에서 25(OH)D를 1,25(OH)₂D로 hydroxylation 하는 효소인데, 신장 이외에도 지방, 뇌, 정소, 면역세포 등에서도 발현이 되는 것이 알려지면서 1,25(OH)₂D가 신장 외의 조직에서 국소적으로 생성되기도 하는 것이 밝혀졌다(Hewison *et al.* 2007, Chun *et al.* 2008). 지방조직에서 CYP27B1과 VDR이 발현되는 것으로 보고되었을 뿐 아니라 혈액의 7배나 되는 높은 수준의 1,25(OH)₂D가 검출되었다(Rungby *et al.* 1993, Abbas 2017). 이는 지방조직에서 1,25(OH)₂D가 활발하게 기능할 가능성을 제시한다. 지방조직에서 비타민 D의 기전은 혈액의 25(OH)D가 조직 내로 들어온 뒤 국소적으로 생성된 1,25(OH)₂D에 의한 것이기도 하며, 혈액 중의 1,25(OH)₂D가 지방조직의 세포막에 있는 VDR과 결합하여 시작되는 것이기도 하나, 아직 명확하게 밝혀진 바는 없다.

비만으로 인해 비대해진 지방세포는 괴저성의 지방세포를 생성하기도 하며 다른 면역세포의 침윤을 증가시켜 염증성 사이토카인의 분비를 증가시키는 모습을 보인다(Cinti *et al.* 2005, Jernas *et al.* 2006). 성숙 혹은 미성숙상태의 3T3-L1 세포에서 1,25(OH)₂D가 NF-κB 신호 체계를

저해하여 항 염증성 효과를 보인다고 보고되었으며, 사람의 지방세포와 면역세포에서도 1,25(OH)₂D가 NF-κB와 MAPK 신호체계를 억제한다고 알려졌다(Mutt *et al.* 2012, Ding *et al.* 2013). 하지만 비타민 D를 식이로 급여하여 실제 지방조직의 염증반응에 미치는 영향을 본 연구는 많지 않다. Lira 등(2011)과 Karkeni 등(2015)이 고지방식으로 유도된 마우스에 비타민 D를 급여하여 지방조직의 IL-6 혹은 케모카인의 감소를 확인하였다. 하지만 Lira 등(2011)은 비타민 D₃가 아닌 활성형의 1,25(OH)₂D의 형태로 마우스에게 제공하였으므로, 실제 대사와는 다른 점이 있을 것으로 예상되며, Karkeni 등(2015)은 대조마우스에 비타민 D를 급여한 효과를 확인하지 않았으므로 더 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구에서는 C57BL/6 마우스에게 비타민 D를 보충하거나 보충하지 않은 대조 식이 혹은 고지방식을 제공하여, 비만이 1,25(OH)₂D 대사에 미치는 영향을 비타민 D 보충 여부에 따라 확인하고자 하였다. 이를 위해 혈청 25(OH)D와 1,25(OH)₂D 농도를 측정하였고, 신장에서 비타민 D hydroxylase 및 비타민 D 대사와 관련된 유전자의 발현을 측정하였다. 또한 보충한 비타민 D가 활성형의 1,25(OH)₂D로 hydroxylation되어 지방조직의 염증반응에 작용하는지를 대조마우스와 비만 마우스에서 확인하였다.

4.2. 연구 방법

4.2.1. 실험 동물 사육

6주령의 수컷 C57BL/6N 마우스 (중앙실험동물, Korea)를 서울대학교 수의과대학 동물 사육장의 SPF room에서 사육하였다. 사육환경은 온도 ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), 상대습도 ($50 \pm 10\%$), 명암 12시간 주기로 일정하게 조절되었다. 첫 5일간은 대조 식이로 적응시킨 뒤, 4군에 임의 배정하여 해당하는 실험 식이를 13주간 제공하였다. 사육기간 동안 마우스의 식이 섭취량은 매주 4회, 체중은 매주 1회 측정하였다.

실험 식이는 AIN-76 정제 식이 조성을 기본으로 하여 지방의 양 (CON, HFD)과 비타민 D₃의 양 (CVd; 대조, HVd; 보충)에 따라 총 4가지로 주문 제작하였다 (CON_CVd, #103816; CON_HVd, #119321; HFD_CVd, #103818; HFD_HVd, #119319; Dyets, Inc., USA). 실험 식이의 전체 조성은 **Table 4-1**에 나타내었다. 대조 식이는 전체 칼로리 중 10%를 지방으로부터, 고지방식이는 전체 칼로리 중 45%를 지방으로부터 공급하며, 비타민 D 대조 식이는 식이 kg당 비타민 D₃ 1,000 IU를, 비타민 D 보충 식이는 식이 kg당 비타민 D₃ 25,000 IU를 포함한다. 실험 식이는 식이는 실험 동물에게 제공되기 전까지 4°C에서 보관하였고, 실험 식이와 멸균된 식수를 자유급여 (*ad libitum*)로 제공하였다.

실험 동물의 구입 및 사육, 희생의 전 과정은 서울대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee of Seoul National University)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다 (승인번호: SNU-141020-4).

Table 4-1. Composition of the experimental diets^a

	CON (10% kcal fat)		HFD (45% kcal fat)	
	CVd (1,000 IU/kg of diet)	HVd (25,000 IU/kg of diet)	CVd (1,000 IU/kg of diet)	HVd (25,000 IU/kg of diet)
Casein (g)	200	200	200	200
L-Cystine (g)	3	3	3	3
Sucrose (g)	350	350	172.8	172.8
Cornstarch (g)	315	315	72.8	72.8
Dyetrose (g)	35	35	100	100
Soybean Oil (g)	45	45	45	45
t-BHQ (g)	0.009	0.009	0.009	0.009
Lard (g)	-	-	157.5	157.5
Cellulose (g)	50	50	50	50
Mineral Mix (g)^b	35	35	35	35
Vitamin Mix (g) (No vit D)	-	10	-	10
Vitamin Mix^c (g)	10	-	10	-
Vit D3 (400,000IU/g)	-	0.0625	-	0.0625
Choline Bitartrate (g)	2	2	2	2
Total (g)	1045	1045	848.1	848.2
kcal/g diet	3.69	3.69	4.64	4.64

^aResource: Dyets, Inc., Bethlehem, PA, USA

^b35 g of mineral mix (Dyets, #200000) provides 5.2 g calcium, 4 g phosphorus, 3.6 g potassium, 1 g sodium, 1.6 g chloride, 0.3 g sulfur, 0.5 g magnesium, 35 mg iron, 6 mg copper, 54 mg manganese, 30 mg zinc, 2 mg chromium, 0.2 mg iodine, 0.1 mg selenium, and 4.2 g sucrose.

^c10 g of vitamin mix (Dyets, #300050) provides 4000 IU vitamin A, 1000 IU vitamin D3, 50 IU vitamin E, 30 mg niacin, 16 mg pantothenic acid, 7 mg vitamin B6, 6 mg vitamin B1, 6 mg vitamin B2, 2mg folic acid, 0.8 mg menadione, 0.2 mg biotin, 10 µg vitamin B12, and 9.8 g sucrose.

4.2.2. 희생 및 시료 수집

13주의 실험 식이 기간이 끝난 뒤, 실험동물을 12시간 동안 금식시켰으며 이산화탄소 과호흡을 통하여 안락사 하였다. 희생 직후 심장 채혈을 통해 약 700~1,000 μL 의 혈액을 얻었으며 신장과 백색지방조직 (신주위지방, 후복강 지방, 부고환 지방, 피하지방)을 분리하였다. 혈액은 상온에서 2시간 정치한 후 3,000 rpm, 4°C 에서 20분간 원심분리 하여 혈청을 분리하였다. 분리한 조직은 PBS (phosphate buffered saline) 용액으로 세척한 뒤 무게를 측정하였다. 혈청과 조직은 모두 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

4.2.3. 혈청 1,25(OH) $_2$ D 농도 측정

혈청 1,25(OH) $_2$ D 농도는 방사면역측정법을 이용한 25-Hydroxyvitamin D 125I RIA Kit 키트를 구입하여 측정하였다 (DiaSorin, USA). 100 μL 의 혈청에 500 μL 의 ACN을 추가하여 섞어준 뒤 760 x g, 20°C 에서 20분간 원심분리 하였다. 분리한 상층액에 pretreatment 용액을 500 μL 추가하여 샘플을 준비하였다.

C18 cartridge를 이용하여 다른 비타민 D의 대사체를 걸러내고 1,25(OH) $_2$ D를 추출하였다. C18 cartridge에 methanol 1 mL 를 넣어 활성화시킨 뒤, 준비된 샘플을 넣는다. 이후 5 mL의 70% methanol, 5 mL의 헥산혼합물 (9:1, hexane/methylene chloride), 5 mL의 헥산혼합물 (99:1, hexane/isopropanol)로 cartridge를 씻어주었다. 이 후 3 mL의 헥산혼합물 (92:8, hexane/isopropanol)로 cartridge에 남아있는 1,25(OH) $_2$ D를 용출시켜 glass tube에 받았다.

후드 내에서 질소가스를 이용하여 받은 액체를 모두 날려준 뒤 95%의 ethanol 50 μL 와 ^{125}I -1,25(OH) $_2$ D 125 μL 에 재용해 하였다. 300

μL 의 goat anti 25(OH)D serum을 분주하여 섞어준 뒤 2시간 동안 상온에서 정치하였다. goat anti rabbit complex 500 μL 를 넣은 뒤 상온에서 20분간 두었다. 1,800 x g, 20°C 에서 20분간 원심분리한 뒤 상층액을 버린 뒤, 감마카운터 (2470 WIZARD 2, Perkin Elmer, USA)를 이용하여 방사능을 측정하였다. 표준액의 방사능의 농도로 표준곡선을 그린 뒤 혈청 1,25(OH)₂D의 농도를 측정하였다.

4.2.4. 혈청 PTH 농도 측정

혈청 PTH 농도는 효소면역측정법을 이용한 Mouse PTH 1-84 ELISA Kit 키트를 구입하여 측정하였다 (Immutopics, San Clemente, CA, USA). Capture Antibody가 붙어있는 96-well plate에 20 μL 의 혈청과 50 μL 의 Working antibody solution을 분주하였다. Sealer로 plate를 밀봉한 뒤 알루미늄 호일로 싸서 빛에 대한 노출을 막았다. Horizontal rotator에 plate를 넣고 220 rpm, 20°C에서 3시간 동안 약하게 흔들여 주었다. 이후 sealer를 벗겨내고, working wash solution을 350 μL 씩 넣어준 뒤 버려주는 워싱 단계를 5번 반복하였다. ELISA HRP 기질을 각 well에 100 μL 씩 넣고 Sealer로 plate를 밀봉하고 차광한 뒤 horizontal rotator에 위와 동일한 조건으로 30분간 섞어주었다. 이후 stop solution을 각 well에 100 μL 씩 넣고 horizontal rotator에서 1분간 섞은 뒤 분광광도계(Spectramax 190, USA)를 이용하여 450 nm에서 파장을 측정하였다. 표준 시료의 흡광도 값을 기준으로 표준곡선을 그려 혈청 PTH 농도를 계산하였다.

4.2.5. 조직 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR 분석

1) RNA 추출

신장과 부고환 지방조직에서 Trizol reagent (Invitrogen, USA)를

이용하여 RNA를 추출하였다. UV용 96-well plate (Corning®, Corning, NY, USA)와 분광광도계(Spectramax 190, USA)를 이용하여 260, 280 nm에서 파장을 측정하여 RNA의 농도와 순도를 확인하였다. Agarose젤에 RNA를 내린 뒤 Gel Doc XR system을 이용하여 RNA의 질을 확인한 뒤에 cDNA 합성 전까지 -80℃에서 보관하였다.

2) cDNA 합성

PrimeScript™ 1st strand cDNA synthesis kit (Takara, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA)로 42℃에서 50분, 95℃에서 5분, 4℃에서 30분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 분석 전까지 -20℃ 조건으로 보관하였다.

3) Real-time PCR

합성한 cDNA를 10배 희석한 뒤, 8-tube strip (0.2 mL)에 cDNA 1 µL, DW 7.8 µL, SYBR Premix Ex Taq (2X) 10 µL, ROX reference dye (50X) 0.4 µL, forward 및 reverse primer 각각 0.4 µL씩 분주하였다. StepOne™ Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 반응시켰다. 반응 조건은 95℃에서 30초의 반응단계 (initiation step)와, 95℃에서 10초의 변성단계 (denaturation step)를 거쳐 60℃에서 30초간 결합 및 증폭단계 (annealing step)를 40회 반복하였다. 모든 실험은 duplicate으로 분석하여 평균값을 얻었고, house-keeping 유전자인 *Gadph*의 발현량으로 보정하였다. 더불어 모든 유전자의 발현량은 대조군의 발현량을 기준으로 하여 상대정량 하였다. 각 유전자 별 primer 염기 서열은 **Table 4-2**에 나타내었다.

Table 4-2. Primer sequences used in real-time PCR

Gene ¹	Forward primer	Reverse primer
<i>Cyp27b1</i>	CCTCTGCCATTCTTCACCAT	CGACCCCTGAGCACCTTAT
<i>Cyp24a1</i>	TCCCTGAGTAATGGGCTTTG	CACGGTAGGCTGCTGAGATT
<i>Lrp2</i>	CCGTTGGGTTTGATTCTACG	GGTCGCTCCTGTTCTCCATA
<i>Mcp1(Ccl2)</i>	AGGCATCACAGTCCGAGTCAC	CCTTTTCCACAACCACCTCAAG
<i>Rantes(Ccl5)</i>	CTTGAACCCACTTCTTCTCTGG	TGCTGCTTTGCCTACCTCTC
<i>Mip1γ(Ccl9)</i>	TGGGTGTTATGTAGTCAAAGGAG	GAGGAAGGAGAGGGCAGTATG
<i>Il-6</i>	CATTTCCACGATTTCCCAGAGA	TCCATCCAGTTGCCTTCTTGGG
<i>Il-1β</i>	GCAACTGTTCTGAACTCAACT	ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
<i>Tnf-α</i>	CTGGAAAGGTCTGAAGGTAGGAAGG	AACACAAGATGCTGGGACAGTGA
<i>Ifn- γ</i>	TGGACCTGTGGGTTGTTGAC	GAACTGGCAAAAGGATGGTG
<i>Gapdh</i>	GGAGAAACCTGCCAAGTA	AAGAGTGGGAGTTGCTGTTG

¹ *Cyp27b1*, cytochrome P450 27B1; *Cyp24a1*, cytochrome P450 24A1; *Lrp2*, megalin; *Mcp-1*, monocyte chemoattractant protein 1; *Rantes*, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; *Mip γ*, macrophage inflammatory protein-1 gamma; *IL-6*, interleukin 6; *IL-1β*, interleukin 1beta; *Tnf-α*, Tumor necrosis factor; *Ifn- γ*, interferon gamma; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase

4.2.6. 통계 분석방법

모든 통계분석은 SPSS Statistics version 23 software (IBM SPSS Statistics, USA)을 사용하여 수행되었다. 식이 중의 비타민 D와 식이의 지방량이 혈중 1,25(OH)₂D 농도 및 1,25(OH)₂D의 영향을 받는 유전자에 미치는 영향을 분석하기 위해 이원배치 분산분석 (Two-way ANOVA)를 수행하였다. 분산분석 결과가 유의적일 경우, Fisher's LSD 검정으로 사후검정 하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (means \pm SEM)로 표기되었으며, 통계 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 이루어졌다.

4.3. 연구 결과

4.3.1. 체중, 조직무게 및 혈청과 지방조직의 25(OH)D 농도

체중, 백색 지방조직량, 식이 섭취량 결과 및 혈청 25(OH)D 농도를 **Table 4-3**에 제시하였다. 초기 체중은 군 간에 유의적인 차이가 없었으나, 13주 후에는 HFD군의 체중이 CON군에 비해 40.2% 더 높았다 ($P < 0.001$). HFD군의 백색지방량 또한 CON군에 비해 103.6% 유의적으로 높게 나타났다 ($P < 0.001$). 비타민 D 대조군(CVd군)에 비해 13주차 체중이 비타민 D 보충군(HVd군)에서 3.4% 낮았으나 ($P = 0.045$), 백색 지방량의 차이는 없었다. 평균 식이 섭취량 (g/day)은 고지방식이 섭취 혹은 비타민 D 섭취 정도에 따라 영향을 받지 않았다.

혈청 25(OH)D 농도는 HVd군이 CVd군에 비해 180% 높았으며, 비타민 D 보충과 고지방식이 사이의 교호작용에 의한 유의적인 영향을 받았다 ($P < 0.001$). CVd군에서는 CON군과 HFD군 사이의 25(OH)D 농도의 차이가 없었으나, HVd군에서는 HFD군의 값이 CON군에 비해 유의적으로 낮았다 ($P < 0.001$). 부고환 지방조직의 25(OH)D 농도도 비타민 D 보충에 의해 전반적으로 증가하였으며 ($P < 0.001$), 고지방식이 섭취에 의해서는 증가하는 경향성을 보였으나 유의적인 차이는 없었다 ($P = 0.089$).

Table 4-3. Body weight, weight gain, body fat, and dietary intake of mice in the CON and HFD groups fed different levels of vitamin D^{1,2}

	CON		HFD		<i>P</i> -value		
	CVd (n=12)	HVd (n=8)	CVd (n=11)	HVd (n=8)	Fat amount	Vitamin D content	Interaction
Body wt. at 0 week (g)	23.1 ±0.3	23.23 ±0.2	22.6 ±0.2	22.7 ±0.2	0.090	0.739	0.825
Body wt. at 13 week (g)	35.1 ±0.4 ^a	34.5 ±1.1 ^a	49.5 ±0.9 ^c	46.7 ±0.8 ^b	< 0.001	0.045	0.435
Weight gain (g)	12.01 ±0.6 ^a	11.2 ±1.2 ^a	26.8 ±1.0 ^c	24.0 ±1.0 ^b	< 0.001	0.059	0.281
White adipose tissue wt. ³ (g)	2.81 ±0.21 ^a	2.64 ±0.29 ^a	5.90±0.11 ^b	5.70 ±0.21 ^b	< 0.001	0.389	0.944
Daily food intake (g/day)	2.97 ±0.09	3.03 ±0.07	3.23 ±0.19	2.80 ±0.08	0.914	0.248	0.132
Serum 25(OH)D levels (ng/mL)	24.0 ±2.5 ^a	83.1 ±1.6 ^c	29.4 ±1.7 ^a	66.7 ±3.7 ^b	0.041	< 0.001	< 0.001
Epididymal fat 25(OH)D levels (ng/g tissue)	3.43 ±0.43 ^a	18.1±2.2 ^b	8.03 ±1.52 ^a	19.5 ±2.1 ^b	0.089	< 0.001	0.364

¹Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. Data are presented as mean ± SEM.

²CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; CVd: Control vitamin D; HVd: High vitamin D.

³White adipose tissue weight included epididymal, subcutaneous, retroperitoneum, and perinephric fat.

4.3.2 혈청 1,25(OH)₂D 농도

혈청 1,25(OH)₂D 농도는 비타민 D 보충군(HVd군)의 값이 비타민 D 대조섭취군(CVd군)에 비해 44.9% 높았다 ($P = 0.008$) (**Figure 4-1**). 하지만 고지방식이를 섭취한 경우엔 비타민 D 보충섭취에 의한 1,25(OH)₂D 농도의 유의적인 차이가 관찰되지 않았다.

고지방식이의 섭취는 전반적으로 혈청 1,25(OH)₂D 농도를 상승시키는 경향성을 보였으며 ($P = 0.076$), CVd군에서는 HFD_CVd군의 값이 CON_CVd군에 비해 유의적으로 52.2% 높았다. 하지만 HVd군에서는 고지방식이 섭취로 인한 혈청 1,25(OH)₂D의 유의적인 차이는 없었다. 혈청 1,25(OH)₂D 농도는 혈청 25(OH)D와 양의 상관관계를 보였다 ($r = 0.443$, $P = 0.030$).

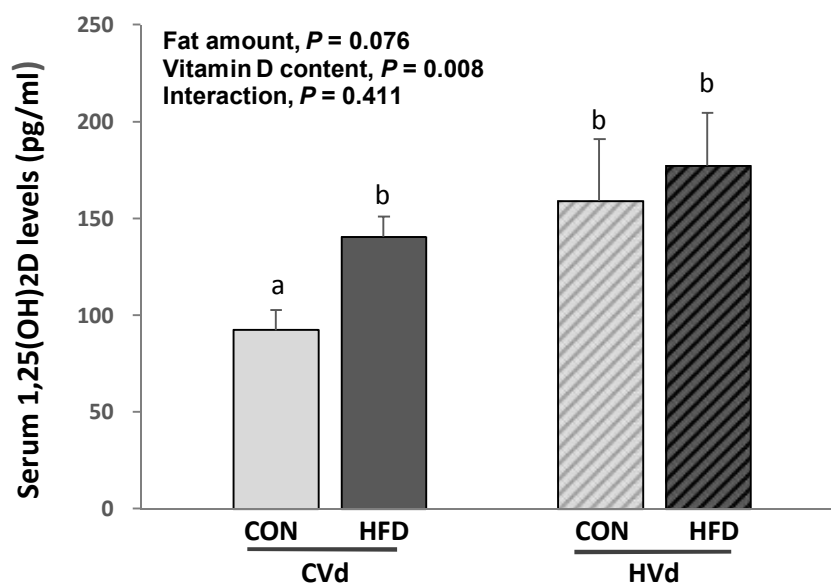


Figure 4-1. Serum 1, 25(OH)₂D levels (pg/ mL)

Data are presented as mean \pm SEM, $n = 6$ for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; CVd: Control vitamin D; HVd: High vitamin D.

4.3.3 혈청 PTH 농도

혈청 PTH의 농도는 비타민 D 보충 혹은 고지방식이 섭취에 의한 유의적인 차이가 없었다 (**Figure 4-2**). 하지만 비타민 D를 보충하지 않은 경우, HFD_CVd군의 혈청 PTH 농도는 CON_CVd군에 비해 유의적으로 39.6% 높았다 (독립 t 검정, $P = 0.038$). 혈청 PTH 농도는 혈청 1,25(OH) $_2$ D 농도와 유의적인 양의 상관관계를 가졌다 ($r = 0.400$, $P = 0.047$).

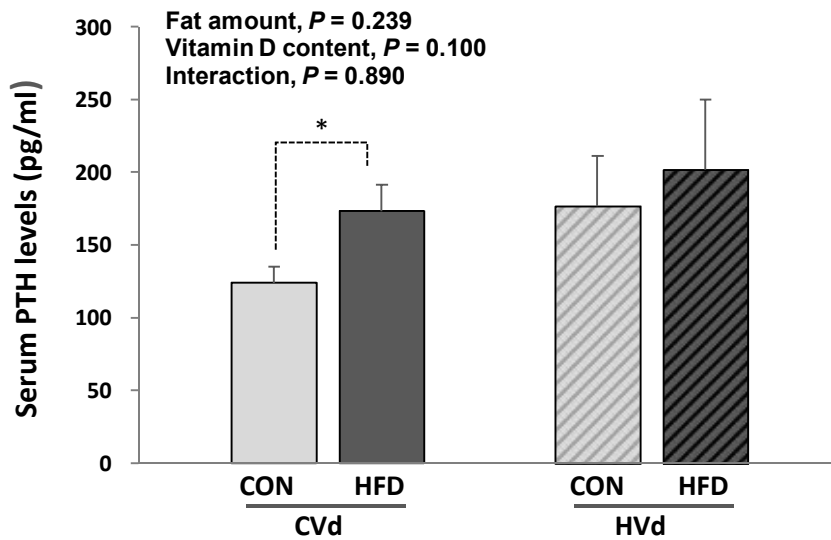


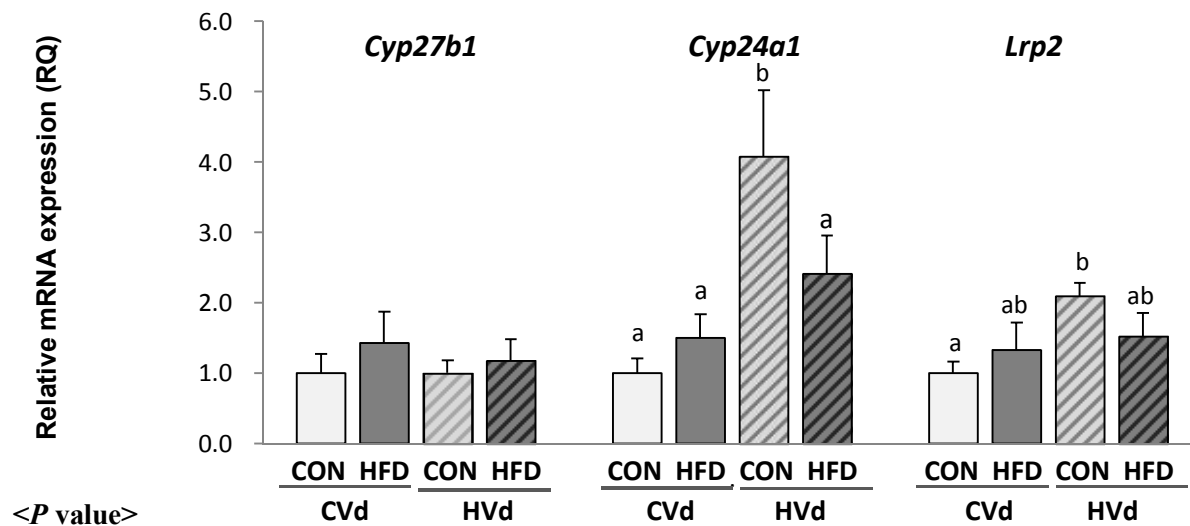
Figure 4-2. Serum PTH levels (pg/ mL)

Data are presented as mean \pm SEM, $n = 5\sim 7$ for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; CVd: Control vitamin D; HVd: High vitamin D.

4.3.4. 신장의 1-hydroxylase, 24-hydroxylase, megalin 발현량

CYP27B1는 25(OH)D를 활성형 비타민 D인 1,25(OH)₂D로 hydroxylation하는 효소로써 신장에서 주로 발현되며, 지방, 뇌 등의 조직이나 면역세포에서도 발견된다. CYP24A1은 25(OH)D 혹은 1,25(OH)₂D을 한번 더 hydroxylation 시켜 비활성형으로 만들어 몸에서 배설되게 하여 체내 1,25(OH)₂D의 항상성을 유지하는 역할을 한다. LRP2(megalin)은 신장에서 재흡수된 25(OH)D를 신장 세포로 유입시키는 수용체이다.

신장의 *Cyp27b1*, *Cyp24a1*, *Lrp2* mRNA 수준은 고지방식이 섭취에 의한 유의적인 영향을 받지 않았다. *Cyp27b1* mRNA 수준은 고지방식이에 의한 유의적인 영향을 받지 않았으나, CVd군에서는 HFD_CVd군의 발현이 CON_CVd군에 비해 높은 경향을 보였다 ($P = 0.071$). *Cyp24a1*의 발현량은 전반적으로 비타민 D 보충에 의해 높은 수준을 보였으나 ($P < 0.001$), 비타민 D 보충과 고지방 식이섭취 여부에 따른 교호작용이 존재하였다 ($P = 0.034$). CON_CVd군에 비해 비타민 D를 보충한 CON_HVd군의 *Cyp24a1* mRNA 수준이 유의적으로 높았던 반면, HFD_CVd군과 HFD_HVd군 사이에는 유의적인 값의 차이가 존재하지 않았다. 또한 *Cyp24a1* mRNA 발현은 혈청 25(OH)D와 유의적인 양의 상관관계를 가졌다 ($r = 0.623$, $P = 0.003$) (**Figure 4-3**). *Lrp2*의 mRNA 발현량은 전반적으로 비타민 D 보충군에서 높았다 ($P = 0.037$).



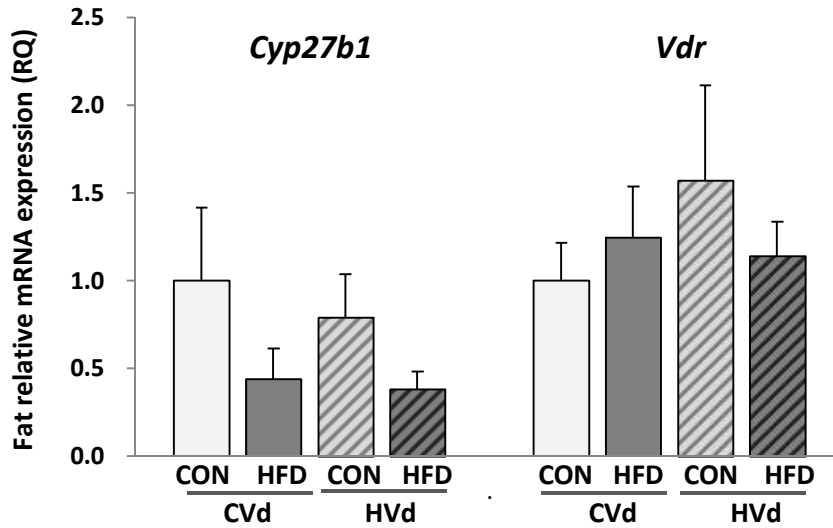
Fat amount	.127	.241	.682
Vitamin D content	.512	.000	.037
Interaction	.499	.034	.138

Figure 4-3. The mRNA levels of genes involved in vitamin D metabolism in kidney

Data are presented as mean \pm SEM, $n = 6\sim 8$ for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; CVd: Control vitamin D; HVd: High vitamin D. *Cyp27b1*, cytochrome P450 27B1; *Cyp24a1*, cytochrome P450 24A1; *Lrp2*, megalin.

4.3.5. 지방조직의 *Cyp27b1* 및 *Vdr* 발현량

부고환 지방조직에서 *Cyp27b1* 및 *Vdr* mRNA 수준을 측정하였다. *Cyp27b1*과 *Vdr* 유전자 발현은 모두 고지방식이 섭취 수준 혹은 비타민 D 보충에 의한 유의적인 영향을 받지 않았다 (**Figure 4-4**).



<P value>

Fat amount	0.141	0.763
Vitamin D content	0.309	0.453
Interaction	0.430	0.282

Figure 4-4. The mRNA levels of *Cyp27b1* and *Vdr* in kidney

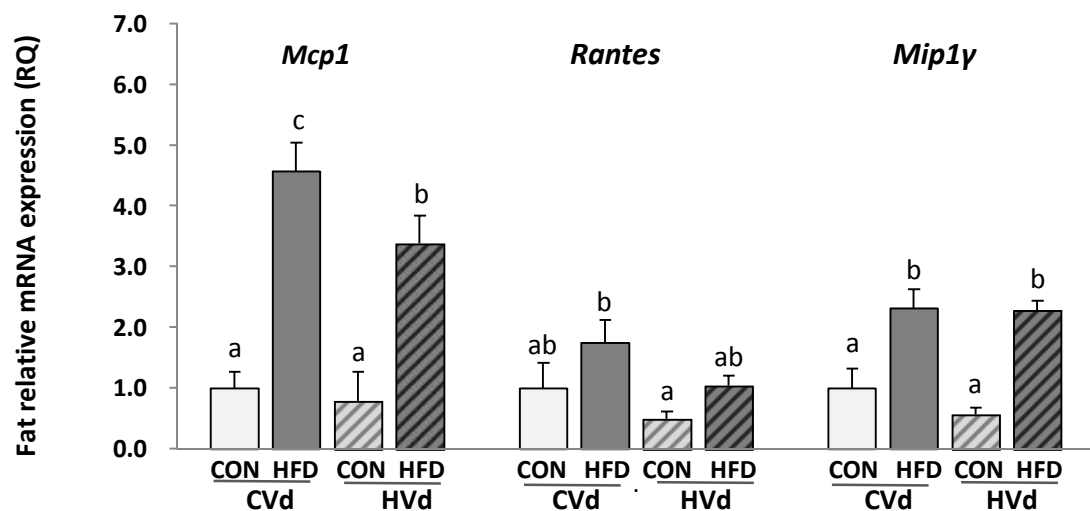
Data are presented as mean \pm SEM, n = 6~8 for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; CVd: Control vitamin D; HVd: High vitamin D., ¹ *Cyp27b1*, cytochrome P450 27B1; *Vdr*, vitamin D receptor.

4.3.5. 지방조직의 케모카인 발현량

지방조직 내 대식세포의 침윤에 기여하며, 다른 사이토카인의 분비에 영향을 미치는 케모카인의 발현을 부고환 지방조직에서 측정하였다 (Figure 4-5).

부고환지방의 *Mcp-1(Ccl2)*, *Rantes(Ccl5)*, *Mip1 γ (Ccl9)* mRNA 수준은 모두 전반적으로 고지방식이 섭취군에서 높은 발현을 보였다 (모두 $P < 0.001$). 또한 *Mcp-1*, *Rantes*, *Mip1 γ* mRNA 수준은 모두 체중 및 백색 지방조직의 양과 유의적인 양의 상관관계를 보였다 (체중: $r = 0.831$, $P < 0.001$, *Mcp-1*; $r = 0.450$, $P = 0.027$, *Rantes*; $r = 0.794$, $P < 0.001$; *Mip1 γ* , 백색지방: $r = 0.828$, $P < 0.001$, *Mcp1*; $r = 0.415$, $P = 0.044$, *Rantes*; $r = 0.763$, $P < 0.001$; *Mip1 γ*).

Mcp-1 mRNA 수준은 전반적으로 비타민 D 보충군에서 낮은 발현을 보였으며 특히 고지방식이군에서는 HFD_HVd군의 발현이 HFD_CVd군에 비해 26% 낮았다 ($P = 0.026$). *Rantes* mRNA 발현량은 전반적으로 비타민 D 보충군에서 43.8% 낮았다 ($P = 0.037$). *Mip1 γ* 의 발현은 비타민 D 보충에 의한 유의적인 차이를 보이지 않았다.



<P value>

Fat amount	0.000	0.000	0.000
Vitamin D content	0.049	0.037	0.309
Interaction	0.158	0.711	0.371

Figure 4-5. The mRNA levels of chemokines in epididymal adipose tissue

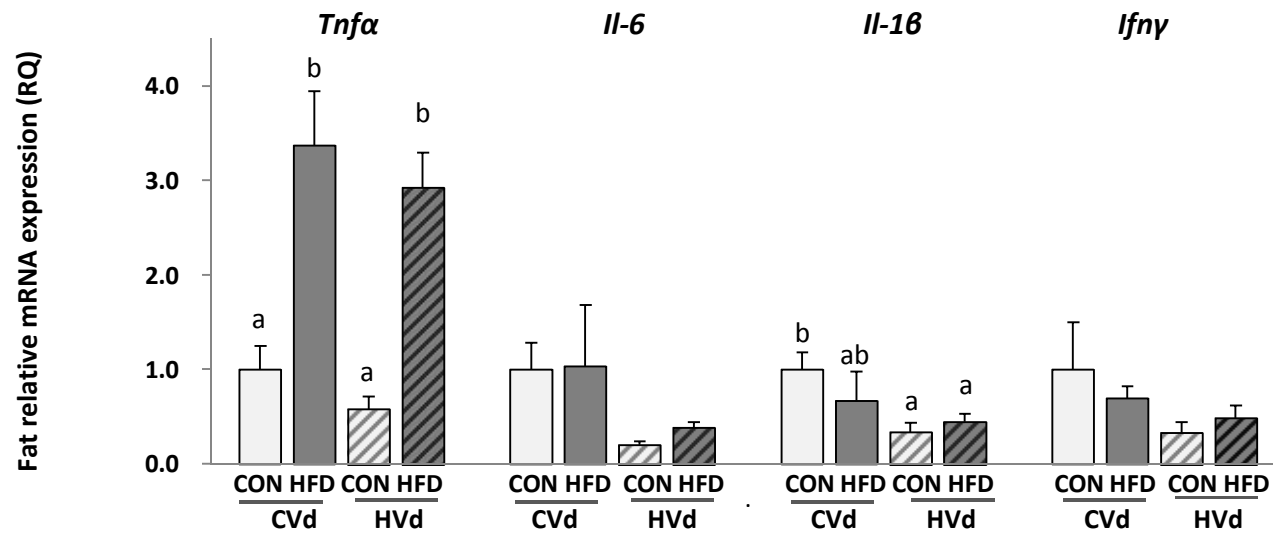
Data are presented as mean \pm SEM, n = 6~8 for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; CVd: Control vitamin D; HVd: High vitamin D, *Mcp-1*, monocyte chemoattractant protein 1; *Rantes*, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; *Mip* γ , macrophage inflammatory protein-1 gamma.

4.3.6. 지방조직의 사이토카인 발현량

부고환 지방조직에서 지방 세포에서 혹은 침윤된 대식 세포를 통해 분비되는 사이토카인 mRNA 수준을 측정하였다 (Figure 4-6).

부고환 지방조직의 *Tnf- α* mRNA 발현량은 전반적으로 고지방식이 섭취군에서 높았으나 ($P < 0.001$), 비타민 D 섭취에 의한 유의적인 변화는 보이지 않았다. 지방조직의 *Il-6*, *Il-1 β* mRNA 발현량은 고지방식이에 의한 유의적인 차이를 보이지 않았으나, 전반적으로 비타민 D 보충에 의해 유의적으로 낮은 수준을 보였다. 뿐만 아니라 혈중 25(OH)D와는 유의적인 음의 상관관계를 보였다 (*Il-6*: $r = -0.485$, $P = 0.019$, *Il-1 β* : $r = -0.448$, $P = 0.037$). *Ifn γ* 의 mRNA 발현량도 비타민 D 보충에 의한 감소 경향성을 보였다 ($P = 0.077$).

부고환 지방조직의 *Tnfa*의 mRNA 발현량은 체중 ($r = 0.833$, $P < 0.001$), 백색 지방조직량 ($r = 0.784$, $P < 0.001$), *Mcp-1* ($r = 0.862$, $P < 0.001$) 및 *Mip1 γ* ($r = 0.902$, $P < 0.001$)의 수준과 유의적인 양의 상관성을 보였다. *Il-6*의 mRNA 발현량은 *Rantes* ($r = 0.408$, $P = 0.048$) 및 *Il-1 β* ($r = 0.672$, $P < 0.001$)와, *Il-1 β* 은 *Rantes* ($r = 0.722$, $P < 0.001$) 및 *Ifn γ* ($r = 0.557$, $P = 0.007$)의 mRNA 수준과 유의적인 양의 상관관계를 보였다.



<P value>

Fat amount	0.000	0.741	0.533	0.757
Vitamin D content	0.215	0.037	0.022	0.077
Interaction	0.974	0.818	0.229	0.342

Figure 4-6. The mRNA levels of cytokines in epididymal adipose tissue

Data are presented as mean \pm SEM, n = 6~8 for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 45% kcal fat diet; CVd: Control vitamin D; HVd: High vitamin D. *Mcp-1*, monocyte chemoattractant protein 1; *Rantes*, regulated on activation, normal T cell expressed and secreted; *Mip* γ , macrophage inflammatory protein-1 gamma; *Il-6*, interleukin 6; *Il-1 β* , interleukin 1beta; *Tnf- α* , Tumor necrosis factor; *Ifn- γ* , interferon gamma.

4.4. 고찰

본 연구에서는 비타민 D를 추가적으로 보충 섭취하거나, 표준으로 섭취하였을 때 비만이 혈중 1,25(OH)₂D 대사에 미치는 영향을 관찰하고, 지방조직의 염증반응에 1,25(OH)₂D가 작용하는지 확인하였다. 선행연구에서 비타민 D를 표준으로 급여한 비만마우스의 경우, 대조마우스에 비해 혈중 1,25(OH)₂D 농도가 유의적으로 높았으며 이와 관련된 혈중 PTH, 신장의 *Cyp27b1*, *Cyp24a1* 발현 수준의 변화가 관측된 바 있다. 본 연구에서는 비타민 D를 충분히 섭취한 경우에도 비만에 의한 혈중 1,25(OH)₂D의 변화가 나타나는지 확인하고자 하였다. 더불어 비타민 D 보충을 통해 생성된 혈액의 1,25(OH)₂D와 지방조직에서 국소적으로 생성된 1,25(OH)₂D가 지방조직의 염증 반응을 완화시키는지 연구하였다.

먼저 혈청 1,25(OH)₂D 농도는 전반적으로 비타민 D를 보충 섭취한 HVd군에서 CVd군에 비해 44.9% 높았다 ($P = 0.008$). 이는 최근에 발표된 메타분석 연구결과(Zittermann *et al.* 2015)와 일치하는 결과로써, 52개의 임상 연구를 분석한 결과에 의하면 비타민 D₃를 보충 섭취한 경우 사람의 혈중 1,25(OH)₂D 수치가 12.2 pmol/L 증가했다. 하지만 반대의 결과도 보고되었는데, Fleet 등(2008)의 연구에 의하면, 10주간 랫트 혹은 마우스에 식이 kg 당 400 ~20,000 IU의 비타민 D₃를 급여한 경우 비타민 D₃의 섭취량이 많을수록 혈중 1,25(OH)₂D가 감소하였다. 섭취한 비타민 D₃에 의한 혈중 1,25(OH)₂D 농도에 대하여 상반된 연구결과가 존재하지만, 혈중 1,25(OH)₂D가 반감기가 수시간으로 짧기 때문에 불안정하며, 비타민 D의 영양적 상태인 부족 혹은 과다 상태를 반영하지 못하다는 점을 고려하면(Alshahrani *et al.* 2013), 비타민 D를 급여한 기간, 희생 전 금식 시간 등이 혈중의 1,25(OH)₂D 수치에 영향을 미칠 것으로 사료된다. 본 연구는 6주령의 마우스에 13주간 실험식이를 급여하였으며, 희생 전 12시간동안 금식하였는데 이와 같은 조건에 의해 Fleet 등(2008)의 연구와 다른 결과가 도출된 것으로 사료된다.

비타민 D를 보충하지 않고, AIN-76A 정제 식이 조성을 바탕으로 한 대조 식이 혹은 고지방식이를 제공한 CVd군의 경우 혈중 1,25(OH)₂D의 수치가 고지방식이 섭취에 의해 상승함으로써 선행연구와 유사한 결과를 보여주었다(Park *et al.* 2015). 혈액의 1,25(OH)₂D는 신장의 근위 세뇨관에 있는 VDR과 반응하여, 신장의 CYP27B1의 발현을 감소시키고 CYP24A1을 증가시켜 결과적으로 혈중 1,25(OH)₂D의 상승을 억제한다(Chow *et al.* 2013, Wang *et al.* 2015). 본 연구 결과 혈청 1,25(OH)₂D의 수치가 CON_CVd군에 비해 HFD_CVd군에서 유의적으로 52.2% 높았고, 혈청 PTH의 수치도 HFD_CVd군에서 39.6% 높았으며 (독립 *t* 검정, *P* = 0.038), 신장의 *Cyp27b1* mRNA 발현은 HFD군에서 높은 경향성을 보였다 (독립 *t* 검정, *P* = 0.071). 또한 CVd군의 혈중 1,25(OH)₂D 혹은 PTH 농도는 최종 체중 (1,25(OH)₂D, *r* = 0.637, *P* = 0.004); PTH, *r* = 0.639, *P* = 0.014)과 백색 지방량 (1,25(OH)₂D, *r* = 0.605, *P* = 0.008); PTH, *r* = 0.574, *P* = 0.032)과 유의적인 양의 상관관계를 보였는데, 이는 마우스의 체지방량이 혈청 1,25(OH)₂D 혹은 혈청 PTH와 상관성이 있다고 보고한 선행연구 결과와도(Jung *et al.* 2018)일치하는 것이다. 하지만 신장의 *Cyp24a1* 및 *Lrp2*의 발현량은 고지방식이에 의한 유의적인 차이가 없었다. 따라서 본 연구결과는 선행연구들과 마찬가지로(Park *et al.* 2015, Jung *et al.* 2018) 비만에서 높아진 혈청 PTH 수준이 신장의 1,25(OH)₂D 생성을 증가시켰으며, 이후 1,25(OH)₂D의 자가 조절 기전이 일부 비만 마우스에서 억제되어 비만마우스에서 대조마우스에 비해 높은 혈청 1,25(OH)₂D 수준이 관측된 것으로 사료된다.

CVd군의 혈청 1,25(OH)₂D 농도가 대조마우스에 비해 비만마우스에서 높았으나, HVd군에서는, 고지방식으로 유도된 비만에 의한 1,25(OH)₂D 농도의 상승은 관찰되지 않았다. 혈청 PTH도 마찬가지로 HVd군에서는 HFD_HVd군과 CON_HVd군 사이에 유의적인 차이가 없었다. Bell 등(1985)은 비만이 이차적인 hyperparathyroidism을 야기하여 혈액의 PTH 수치를 증가시킨다고 하였는데, 비타민 D를

보충한 경우는 이미 1,25(OH)₂D 수치가 증가한 상태이므로 비타민 D 보충에 의한 PTH 상승도, 고지방식이가 유도한 비만에 의한 PTH 상승도 관측되지 않았다. 선행연구에서도 비타민 D가 충분한 상태에서 비타민 D를 보충하는 경우엔 PTH 수치에 영향을 미치지 않는다고 보고된바 있다(Holick 2012). PTH 수치와는 별개로 HFD_HVd군의 경우, 혈중 25(OH)D의 수치가 CON_HVd군에 비해 19.7% 유의적으로 낮았고, 신장의 *Cyp27b1* 발현도 두 군간에 유의적인 차이가 없었으므로, HFD_HVd군의 혈청 1,25(OH)₂D도 CON_HVd군에 비해 낮을 것이 예상되었으나, 실제 수치는 HFD_HVd군과 CON_HVd군 사이에 차이가 없었다. 이는 고지방식이군에서 비타민 D를 보충한 경우 신장의 *Cyp24a1* 조절을 통한 혈중 1,25(OH)₂D의 항상성 유지가 원활하게 이루어지지 않았기 때문으로 사료된다. 신장의 *Cyp24a1*은 혈액의 1,25(OH)₂D에 의해 발현이 증가되며, 혈청 1,25(OH)₂D를 calcitroic acid로 hydroxylation시켜 불활성화된 비타민 D를 담즙이나 소변으로 배설시키는 역할을 한다(Jones *et al.* 2012, Chow *et al.* 2013). 저지방식이 섭취 시, 비타민 D를 보충한 CON_HVd군의 신장의 *Cyp24a1* 발현이 비타민 D를 보충하지 않은 CON_CVd군의 값에 비해 높았는데, 이는 비타민 D 보충섭취를 통해 높아진 CON_HVd군의 혈중 1,25(OH)₂D 수치를 낮추기 위한 기전으로 사료된다. 반면 고지방식이를 섭취한 경우, 비타민 D 보충에 의한, 신장의 *Cyp24a1* 발현상승이 관찰되지 않았다. 따라서 고지방식으로 유도된 비만은 혈액의 1,25(OH)₂D의 조절이상을 일부 야기하는 것으로 사료된다.

1,25(OH)₂D는 신장에서 생성될 뿐 아니라, CYP27B1이 존재하는 조직에서 국소적으로 생성된다. 본 연구에서도 부고환 지방에서 *Cyp27b1* 및 *Vdr* mRNA 수준이 관찰되었다. 비타민 D를 식이로 보충한 경우 고지방식이군의 지방조직의 염증 반응이 완화되었는데, 이는 혈액의 1,25(OH)₂D 뿐 아니라 지방조직에서 국소적으로 생성된 1,25(OH)₂D가 작용한 것으로 사료된다. 왜냐하면 고지방식이를 섭취한 HFD_HVd군과

HFD_CVd군 사이에 혈청 1,25(OH)₂D 차이가 없었던 반면, 지방조직의 25(OH)D 농도는 HFD_CVd군에서 HFD_CVd군에 비해 높았기 때문이다. 지방조직의 *Cyp27b1*의 발현은 비타민 D 보충에 의한 차이가 없었으므로, 지방에서 생성된 1,25(OH)₂D는 25(OH)D와 마찬가지로 HFD_CVd군보다 HFD_HVd군에서 더 높을 것으로 예상된다. 본 연구에서 직접 지방조직의 1,25(OH)₂D 수준을 측정하지 못하였지만 선행연구에 의하면 혈액보다 7.6배 높은 수준의 1,25(OH)₂D가 지방조직에서 관찰된 바 있다(Rungby *et al.* 1993). 따라서 지방조직에서 자가 분비된 1,25(OH)₂D가 높은 비율로 지방조직의 1,25(OH)₂D 기전에 기여하였을 가능성이 있다.

부고환 지방조직에서 대식세포나 호중구와 같은 면역세포를 지방조직에 침윤되도록 하는 케모카인의 발현 수준을 측정하였다. 그 결과 전반적으로 *Mcp-1(Ccl2)*, *Rantes(Ccl5)*의 발현은 고지방식이 섭취군에서 높았으며, 비타민 D 보충섭취에 의해 낮아졌다. 특히 *Mcp-1*은 수준은 HFD_HVd군에서 HFD_CVd군에 비해 26.1% 낮은 발현을 보였다 ($P = 0.020$). 지방조직의 *Il-6*와 *Il-1β* mRNA 수준도 비타민 D 보충섭취로 인해 유의적으로 낮아졌다. HVd군의 mRNA 수준은 CVd군에 비해 *Il-1β*은 52% 낮았고 ($P = 0.018$), *Il-6*은 69% 낮았다 ($P = 0.037$). 부고환 지방조직의 케모카인 및 *Tnfα* mRNA 수준이 고지방식이 섭취에 의해 높았던 것과는 달리, *Il-6*, *Il-1β*의 발현이 고지방식이 섭취군에서 높게 관측되지 않았다. 일반적으로 비만은 지방조직의 염증성 사이토카인을 증가시키는 것으로 알려져 있다(Fantuzzi 2005, Tilg *et al.* 2006). 하지만 60% 고지방식으로 비만을 유도한 다른 선행연구에서도 비만군의 유의적인 체중 및 백색지방조직의 증가에도 불구하고 지방조직, 간, 그리고 혈액에서 IL-6와 IL-1β가 증가하지 않았으며, 고지방식이 섭취만으로 조직의 세포 변성 및 염증을 야기하려면 20주 이상의 고지방식이 섭취가 필요 할 것이라고 고찰했다(Zhao *et al.* 2015). 따라서 본 연구에서 45%의 고지방식으로 13주간 비만을 유도한 마우스의 경우 지방조직의 케모카인 (*Mcp-1*, *Rantes*, *Mip1γ*)의 분비가 증가하였음에도

불구하고 아직 많은 면역세포가 지방조직으로 침윤되지 않았기 때문에 염증성 사이토카인의 발현이 증가하지 않은 것으로 사료된다.

비타민 D 보충섭취에 의한 지방조직 내 염증 완화는 선행연구와 일치하는 결과로써, Karkeni 등(2015)도 식이로 유도한 비만마우스에 비타민 D를 섭취시켜 케모카인과 염증성 사이토카인 mRNA 수준의 감소를 확인하였으며, Lira 등(2011)도 비만마우스에 1,25(OH)₂D를 급여하여 혈중 IL-6의 단백질 농도가 감소함을 확인하였다. 하지만 선행연구에 비해 본 연구에서는 *Mcp-1*을 제외하고 HFD군에서 증가한 다른 염증성 지표들이 비타민 D 섭취에 의해 유의적으로 감소되지 않았으며, *Mip1* γ (*Ccl9*)와 *Tnf* α 의 수준은 전반적으로 고지방식이 섭취에 의해 높았으나, 비타민 D 섭취의 유의적인 영향을 받지 않았다. Karkeni 등(2015)은 비만마우스에서 비타민 D의 효과를 확인하기 위해 AIN-76에 기초한 고지방식이에 마우스 무게(kg)당 3,000 IU를 추가 제공하였고, 본 연구는 식이 kg당 25,000 IU 제공하였다. 이를 기준으로, 하루 3 g의 고지방식이를 섭취하는 35 g의 마우스가 섭취하는 비타민 D의 양을 가정해보면 본 연구는 75 IU, 선행연구는 108 IU정도를 섭취하였다. 따라서 본 연구에서 제공한 양은 선행연구의 70% 수준으로 비타민 D 섭취를 증가시켰을 경우, 지방조직에서 염증과 관련된 지표가 더 완화되었을 가능성이 존재한다.

본 연구는 비타민 D를 보충하였을 때, 비만이 혈액의 1,25(OH)₂D 대사 및 지방조직의 염증반응에 미치는 영향을 확인하였다. 비타민 D를 보충하지 않았을 때, 비만이 혈액의 PTH와 1,25(OH)₂D 농도를 상승시킨 것과 달리, 비타민 D를 보충 섭취하였을 때는, 비만에 의한 혈액의 1,25(OH)₂D 및 PTH 농도 상승이 관찰되지 않았다. 하지만 비타민 D를 보충한 경우, 혈중 1,25(OH)₂D 수준이 증가하였음에도 불구하고 대조마우스와 달리, 비만마우스의 신장 *Cyp24a1* 발현이 상승하지 않았다. 따라서 비타민 D를 보충한 경우에도 여전히 혈중 1,25(OH)₂D의 자가조절기전이 비만에 의해 일부 저해된 것으로 보인다. 또한 비타민 D

섭취는 부고환 지방조직의 케모카인과 사이토카인의 mRNA 발현을 낮춤으로써 염증반응완화에 기여하였다. 부고환 지방조직에 존재하는 25(OH)D의 수준을 확인하였고, 1,25(OH)₂D의 생성과 기능에 관여하는 *Cyp27b1*과 *Vdr* 발현이 지방조직에서 확인되었으므로, 지방조직에서 자가 생성된 1,25(OH)₂D가 지방조직의 염증완화작용에 기여한 것으로 보인다.

제 5 장 비만마우스의 지방조직 내 지방조직유래혈관세포(SVC)와 지방세포의 염증반응에 1,25(OH)₂D₃가 미치는 영향

5.1. 서론

비만은 제2형 당뇨병, 지방간, 동맥경화증과 같은 대사성 질환의 발병에 기여하는 것으로 알려져 있다. 비만은 지방조직과 간 등의 조직에서 염증성 사이토카인의 분비를 증가시키는데, 이러한 만성적인 정도의 염증 상태는 체내의 정상적인 당 대사 및 지질 산화 기전을 저해하여 대사성 질환을 야기한다고 보고되었다(Saltiel *et al.* 2017). 최근 다수의 연구를 통해 비만인 사람들에게서 비타민 D 결핍 (혈청 25(OH)D 농도 20 ng/mL 미만)의 비율이 높다는 결과가 보고되었으며(Cheng *et al.* 2010, Mai *et al.* 2012, Pereira-Santos *et al.* 2015), 비타민 D 부족이 비만으로 인한 대사성 질환의 발병에도 영향을 준다고 알려졌다. 더불어 활성형의 1,25(OH)₂D가 내재 면역에 관계된 염증반응의 완화에 기여하는 것이 알려지면서, 비만인 사람이 추가적으로 비타민 D를 보충해야 할 필요성이 제기되었다.

지방조직은 260개 이상의 단백질을 분비하는 활발한 내분비적 기관으로써 에너지를 저장하는 역할을 할 뿐 아니라 면역과 염증반응에도 관여한다(Lehr *et al.* 2012). 특히 비만은 지방세포의 hypertrophy를 야기하여 MCP-1과 같은 케모카인의 분비를 상승시키며, 이는 지방조직 내로 대식세포나 호중구와 같은 면역세포의 침윤을 야기한다(Watanabe *et al.* 2013). 마른 지방조직의 경우 대식세포의 양이 지방조직 내 면역세포수의 10% 이내인 것에 비해, 비만한 지방조직의 대식세포 양은 50% 이상인 것으로 나타났다(Weisberg *et al.* 2003). 대식세포나 호중구에 존재하는 세포막 수용체인 TLR은 LPS이나

bacterial DNA와 같은 pathogen-associated molecular patterns(PAMP)와 결합할 뿐 아니라 지방산과도 반응하여 NF- κ B나 MAPK 신호기전을 통해 염증성 사이토카인의 분비를 촉진한다고 보고되었다. 비만에서 증진된 지방분해작용을 통해 생성된 지방산들이 면역세포의 TLR2, TLR4와 반응하여 염증기전에 관계된 유전자의 발현수준을 높이는 것으로 나타났다(Lee *et al.* 2001, Takeda *et al.* 2003, Wong *et al.* 2009).

지방조직에 존재하는 지방세포와 면역세포에 VDR이 존재하는 것이 알려지면서 1,25(OH) $_2$ D가 지방조직의 지방생성, 면역 및 염증 반응에 작용하는 것이 밝혀졌다. Sun 등(2008)은 성숙한 3T3-L1 세포에 1,25(OH) $_2$ D를 처리한 결과 세포의 IL-6, MCP-1, TNF α 의 발현이 증가한다고 보고한 반면, 다수의 선행연구에서는 사람과 마우스의 pre-adipocyte 혹은 지방세포에 1,25(OH) $_2$ D를 처리한 결과, 염증성 사이토카인의 분비가 감소했다고 보고하였다(Lira *et al.* 2011, Mutt *et al.* 2012, Gao *et al.* 2013). 사람의 PBMC와 마우스의 골수세포에서도 *in vitro* 1,25(OH) $_2$ D 처리가 NF- κ B나 MAPK 신호기전을 저해하는 것으로 알려졌다(Zhang *et al.* 2012). 하지만 1,25(OH) $_2$ D가 지방세포의 염증 기전에 미치는 영향에 대하여 상반된 결과가 존재하며, 1,25(OH) $_2$ D가 비만한 사람의 지방조직에서 분리한 지방세포나 면역세포에 미치는 영향을 연구한 결과는 현재로써 거의 없다. 뿐만 아니라 선행연구에서 분화되지 않은 pre-adipocyte가 stromal vascular fraction의 일부라 하여 대식세포와 같은 작용을 한다고 가정한 뒤 1,25(OH) $_2$ D가 pre-adipocyte에 미치는 염증완화효과를 지방조직 내 SVC에서의 효과로 간주하였으므로(Gao *et al.* 2013), 실제 지방조직에서 유래한 SVC에 1,25(OH) $_2$ D가 미치는 영향에 대한 연구가 필요한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 고지방식이 섭취와 비타민 D의 보충 섭취가 마우스의 지방조직 내 면역세포 비율의 변화에 미치는 영향을 확인하고, 고지방식으로 비만을 유도한 마우스와 대조마우스의 지방조직에서 지방세포와 SVC를 분리한 뒤 *in vitro*로 1,25(OH) $_2$ D $_3$ 를 처리하여 각

세포에서 분비되는 염증성 사이토카인의 생성에 비타민 D가 미치는 영향을 알아보려고 하였다.

5.2. 연구 방법

5.2.1. 실험 동물 및 식이

5.2.1.1. 1차 실험

5주령의 수컷 마우스 (C57BL/6N)를 중앙 실험 동물 (Korea)에서 구입하여 서울대학교 수의과대학 동물 사육장의 SPF room에서 온도 ($23 \pm 1^{\circ}\text{C}$), 상대습도 ($50 \pm 10\%$), 명암 12시간 주기의 일정한 환경 아래 사육하였다. 3일 간의 적응 기간을 가진 후, 군당 평균 체중이 유사하도록 네 군에 임의 배정하여 해당하는 실험 식이를 14주간 제공하였다. 식이 섭취량은 주 4회, 체중은 주 1회 측정하였다.

실험 식이는 AIN-76 정제 식이 조성을 기본으로 하여 지방의 양 (대조식이군; CON, 고지방식이군; HFD)과 비타민 D₃의 양 (대조; DC, 보충; DS)에 따라 총 4가지로 Research Diets Inc. (New Brunswick, NJ, USA)에서 주문 제작 하였다. 대조 식이(CON)는 전체 칼로리 중 10%를 지방으로부터, 고지방식이(HFD)는 전체 칼로리 중 45%를 지방으로부터 공급하며, 비타민 D 대조 식이(DC)는 식이 kg당 비타민 D₃ 1,000 IU를, 비타민 D 보충 식이(DS)는 식이 kg당 비타민 D₃ 10,000 IU를 포함한다. 실험 식이의 전체 조성은 **Table 5-1**에 나타내었다. 실험 식이는 실험 동물에게 제공되기 전까지 4°C에서 보관하였고, 실험 식이와 멸균된 식수를 자유급여 (*ad libitum*)로 제공하였다.

실험 동물의 구입 및 사육, 희생의 전 과정은 서울대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee of Seoul National University)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다 (승인번호: SNU-171010-1-1).

5.2.1.2. 2차 실험

5주령의 수컷 마우스 (C57BL/6N)를 중앙 실험 동물 (Korea)에서 구입하여 서울대학교 실험동물자원관리원 동물사육장 semi-SPF room에서 사육하였다. 사육기간 동안 사육실의 환경은 온도 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$, 상대습도 $55 \pm 10\%$, 명암 12시간 주기로 유지되었다. 3일 간의 적응 기간을 가진 후, 군당 평균 체중이 유사하도록 대조식이군(CON)과 고지방식이군(HFD)으로 임의 배정하였다. 12주 동안 사육하였고 식이 섭취량은 주 4회, 체중은 주 1회 측정하였다.

실험 식이는 지방 급원으로부터의 열량이 전체 열량의 10%인 대조식이(CON)와 60%인 고지방식이(HFD) 두 가지로 제공되었다. 두 식이는 모두 Research Diets Inc. (USA)에서 제조되었으며 대조식은 #D12450B 제품을, 고지방식이는 #D12492 제품을 이용하였다. 실험 식이의 조성은 **Table 5-2**에 제시하였다. 식이는 실험 동물에게 제공되기 전까지 4°C 에서 보관하였고, 실험 식이와 멸균된 식수를 자유급여 (*ad libitum*)로 제공하였다.

실험 동물의 구입 및 사육, 희생의 전 과정은 서울대학교 동물실험윤리위원회 (Institutional Animal Care and Use Committee of Seoul National University)의 승인을 받았으며, 규정에 따라 수행되었다 (승인번호: SNU-170404-10-2).

Table 5-1. Composition of the experimental diets (1)

	Normal diet (g) (10% kcal Fat)		High fat diet (g) (60% kcal Fat)	
	CON_DC (D12450H)	CON_DS	HFD_DC (D12451)	HFD_DS
Casein, 30 Mesh	200	200	200	200
L-Cystine	3	3	3	3
Corn Starch	452.2	452.2	72.8	72.8
Maltodextrin 10	75	75	100	100
Sucrose	172.8	172.8	172.8	172.8
Cellulose, BW200	50	50	50	50
Soybean Oil	25	25	25	25
Lard	20	20	177.5	177.5
Mineral Mix ¹	10	10	10	10
DiCalcium Phosphate	13	13	13	13
Calcium Carbonate	5.5	5.5	5.5	5.5
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	16.5	16.5	16.5
Vitamin Mix ²	10	0	10	0
Vitamin Mix (No vitD)	0	10	0	10
Vitamin D3 (100,000IU/g)	0	0.09	0	0.09
Choline Bitartrate	2	2	2	2
FD&C Yellow Dye #5	0.04	0	0	0.025
FD&C Red Dye #40	0.01	0	0.05	0
FD&C Blue Dye #1		0.05	0	0.025
Total	1,055.05	1,055.14	858.15	858.24
kcal/g diet	3.85	3.84	4.73	4.73

Resource: Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA

¹ 10 g of Mineral Mix (Research Diets Inc., #S10026) provides 1.0 g of Na, 1.6 g of Cl, 0.5 g of Mg, 0.33 g of S, 59 mg of Mn, 37 mg of Fe, 29 mg of Zn, 6.0 mg of Cu, 2.0 mg of Cr, 1.6 mg of Mo, 0.16 mg of Se, 0.9 mg of Fl, 0.2 mg of I, and 3.99 g of sucrose.

² 10 g of Vitamin Mix (Research Diets Inc., #V10001) provides 4000 IU of vitamin A, 1000 IU of vitamin D₃, 50 IU of vitamin E, 0.5 mg of menadione, 0.2 mg of biotin, 10 µg of vitamin B₁₂, 2 mg of folic acid, 30 mg of niacin, 16 mg of pantothenic acid, 7 mg of vitamin B₆, 6 mg of vitamin B₂, 6 mg of vitamin B₁, and 9.78 g of sucrose.

Table 5-2. Composition of the experimental diets (2)

	Normal diet (g), CON (10% kcal Fat)	High fat diet (g), HFD (60% kcal Fat)
Casein, 30 Mesh	200	200
L-Cystine	3	3
Corn Starch	315	72.8
Maltodextrin 10	35	125
Sucrose	350	68.8
Cellulose, BW200	50	50
Soybean Oil	25	25
Lard	20	245
Mineral Mix ¹	10	10
DiCalcium Phosphate	13	13
Calcium Carbonate	5.5	5.5
Potassium Citrate, 1 H ₂ O	16.5	16.5
Vitamin Mix ²	10	10
Choline Bitartrate	2	2
FD&C Yellow Dye #5	0.05	0
FD&C Red Dye #40	0	0.05
Total	1,055.05	773.85
kcal/g diet	3.85	5.24

Resource: Research Diets Inc., New Brunswick, NJ, USA

¹ 10 g of Mineral Mix (Research Diets Inc., #S10026) provides 1.0 g of Na, 1.6 g of Cl, 0.5 g of Mg, 0.33 g of S, 59 mg of Mn, 37 mg of Fe, 29 mg of Zn, 6.0 mg of Cu, 2.0 mg of Cr, 1.6 mg of Mo, 0.16 mg of Se, 0.9 mg of Fl, 0.2 mg of I, and 3.99 g of sucrose.

² 10 g of Vitamin Mix (Research Diets Inc., #V10001) provides 4000 IU of vitamin A, 1000 IU of vitamin D₃, 50 IU of vitamin E, 0.5 mg of menadione, 0.2 mg of biotin, 10 µg of vitamin B₁₂, 2 mg of folic acid, 30 mg of niacin, 16 mg of pantothenic acid, 7 mg of vitamin B₆, 6 mg of vitamin B₂, 6 mg of vitamin B₁, and 9.78 g of sucrose.

5.2.2. 희생 및 시료 수집

14주의(2차: 12주) 실험 식이 기간이 끝난 뒤, 실험동물을 12시간 동안 금식시켰으며 이산화탄소 과호흡을 통하여 안락사시켰다. 희생 직후 심장 채혈을 통해 약 700~1,000 μ L의 혈액을 얻었으며 상온에서 2시간 정치한 후 3,000 rpm, 4°C 에서 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 백색지방조직(부고환지방, 신주위지방, 후복강지방, 피하지방)을 분리하였다. 내장지방(부고환지방, 신주위지방, 후복강지방)은 무게 측정 후 일부는 따로 tube에 보관하고, 나머지는 지방세포와 stromal vascular cell (SVC) 분리를 위해 분리 전까지 amphotericin (250ng/ ml)이 첨가된 PBS에 담가 클린벤치에 두었다. 혈청과 분리한 조직은 모두 분석 전까지 -80°C 에서 보관하였다.

5.2.3. 지방조직 내 면역세포의 유세포 분석

5.2.3.1. SVC중 면역세포의 분리

Amphotericin (250ng/ ml)이 첨가된 PBS에 담긴 내장 지방조직을 가위를 사용하여 잘게 잘라서 collagenase 1mg/ mL, 2% bovine serum albumin (BSA)을 함유한 Dulbecco's modified eagle's media (DMEM, Gibco, Grand Island, NY, USA) 배지에 옮겨 담았다. Water bath를 이용하여 37°C, 170 cycle/ min 조건에서 한 시간 동안 교반하였다. 200 μ m의 nylon mesh를 이용하여 조직의 잔해를 제거한 뒤 1,500 rpm, 상온 조건으로 5분 동안 원심분리 하여 바닥의 Stromal vascular fraction을 분리하였다. 이후 percoll (Sigma Aldrich, USA)를 사용한 밀도침강법을 이용하여 면역세포를 다시 분리하였다. 10xPBS와 percoll 용액을 1:9로 혼합하여 100% percoll용액을 제조한 뒤 이를 1xPBS 용액과 혼합하여 70% percoll, 40% percoll을 만들었다. 15 mL tube에 70% percoll 3 mL 넣은 후 밀도층이 유지되도록 매우 조심스럽게 40% percoll 3 mL 을 쌓아주었다. 750 \times g, 20°C 조건에서

30분간 원심분리하여 70% percoll과 40% percoll 사이 층에 있는 면역세포층을 분리했다. 12 mL DMEM(10% fetal bovine serum, FBS)을 넣어준 뒤, $1,800 \times g$, 20℃ 조건에서 5분간 원심분리하여 1 mL의 DMEM(10% FBS)에 재용해 한 뒤 일부를 cell counting하였다.

5.2.3.2. 유세포 분석

대식세포, T 세포, B 세포, NK 세포의 비중을 확인하기 위하여 분리한 SVC의 면역세포를 fluorescence-activated cell sorting (FACS) 타입인 FACS Calibur II (BD Biosciences, USA) 장비로 분석하였다. 회수된 세포를 FACS staining buffer (1% FBS 및 0.09% sodium azide가 포함된 PBS)로 재용해한 후, 샘플 당 2×10^5 cells의 세포를 BD PharMingen (San Diego, CA, USA)에서 구입한 항체와 함께 4℃에서 차광한 상태로 30분 동안 반응시켰다. 실험에 사용된 항체는 **Table 5-3**에 제시하였다.

30분 간의 항체 염색이 끝난 세포들을 FACS staining buffer로 washing하고 fixer buffer (4% formaldehyde가 포함된 PBS)로 고정시킨 후 FACS staining buffer에 재용해하였고, FACSCalibur II를 사용하여 염색 결과를 확인하였다. 데이터는 FlowJo software version 10 (Tree Star Inc., Ashland, OR, USA) 프로그램을 이용하여 분석하였다.

Table 5-3. Cell surface markers for murine immune cells in adipose tissue

Cell	Surface Markers
Macrophage	Percp-CD45, FITC-CD11c, PE-F4/80, APC-CD11b
CD4 T cells	Percp-CD45, APC-CD4
CD8 T cells	Percp-CD45, PE-CD8
B cells	Percp-CD45, FITC-CD3, PE-CD19
NK cells	Percp-CD45, FITC-CD3, PE-NK1.1, APC-CD11b

5.2.4. 배지 및 1,25(OH)₂D₃ 용액의 준비

기본 배지는 DMEM(Gibco, USA)이며, 100,000 U/L 농도의 penicillin (GibcoBRL, USA)과 100 mg/L 농도의 streptomycin (GibcoBRL, USA)을 배지 부피의 1%가 되도록 섞어서 사용하였다. 세포의 분리 및 배양을 위해서는 사용 직전 FBS (GibcoBRL, USA)를 배지 부피의 10%가 되도록 추가하였다.

1,25(OH)₂D₃ (Sigma Aldrich, USA)를 0.22 µm 필터로 여과한 100% ethanol에 용해시켜, 10 µM 농도의 stock solution을 제조하였다. 1회 사용 분량으로 소분한 뒤 차광하여 -20℃에 보관하였다. 실험 직전에 1,25(OH)₂D₃ solution을 DMEM(10%FBS)배지로 10 nM 농도로 희석하여 사용하였다.

5.2.5. 지방조직에서 지방세포와 SVC 분리 및 배양

Amphotericin (250ng/ ml)이 첨가된 PBS에 담긴 부고환 지방조직을 가위를 사용하여 잘게 잘라서 collagenase 1mg/ mL, 2% BSA를 함유한 DMEM 배지에 옮겨 담았다. Water bath를 이용하여 37℃, 170 cycle/ min 조건에서 한 시간 동안 교반하였다. 200 µm의 nylon mesh를 이용하여 조직의 잔해를 제거한 뒤 1,500 rpm, 상온 조건으로 5분 동안 원심분리 하였다. 이후 상층액은 지방세포 분리를 위해 15 mL tube로 옮겨 담고, 중간층은 aspiration 시켜준 뒤, 바닥의 세포는 SVC 분리를 위해 준비하였다.

먼저 지방세포 분리를 위해 옮겨 담은 상층액은 제일 윗층의 기름을 제거한 후 DMEM(10% FBS) 5 mL를 넣어 1,500 rpm, 상온 조건으로 5분 동안 원심분리 한 뒤 파스퇴르 파이펫으로 하층액을 aspiration 하여 위에 뜬 지방세포를 씻어준다. 동일한 방법으로 두 번 더 지방세포를

씻어준다. 일부를 trypan blue로 염색한 뒤 혈구계수기 (Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)로 counting하였다. 지방세포는 DMEM(10% FBS)배지 2 mL에 2×10^6 cells/mL 농도로 6-well plate에 배양되었다. 이때 배양 계획에 따라 희석된 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 용액을 해당 배지에 10 nM 농도가 되도록 추가하였으며 대조군은 ethanol을 0.1% 농도로 추가한 대조 배지를 사용하였다. 세포는 5% CO_2 농도가 유지되는 습윤한 조건에서 37°C로 24시간 동안 배양한 뒤 LPS (100 ng/mL, Sigma Aldrich, USA) 혹은 동량의 배지를 추가하여 24시간 더 배양하였다. 이 후 1,500 rpm, 상온 조건으로 5분 동안 원심분리 하고 세포와 배양액을 분리하여 분석 전까지 -80°C에서 보관하였다.

SVC분리를 위해 원심분리 후 남은 세포에 ACK buffer (GibcoBRL, USA) 1 mL를 분주하고 pipetting한 다음 1분 동안 정치하여 적혈구를 용혈시켰다. 이 후 4 mL의 DMEM(10%FBS)를 추가하여 1,500 rpm, 상온 조건으로 5분 원심분리하여 세포를 씻어주는 과정을 두 번 반복하여 세포의 손상을 최소화하였다. 지방세포와 마찬가지로 일부를 trypan blue로 염색한 뒤 혈구계수기로 counting하였다. DMEM(10% FBS)배지 1 mL에 2×10^5 cells/mL 농도로 12-well plate에 배양되었다. 이후 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 용액의 처리 및 LPS 추가 조건은 위의 지방세포와 동일하다. 배양 후 1,500 rpm, 상온 조건으로 5분 동안 원심분리 하여 상층액을 분리하였으며, 바닥의 SVC는 RNAiso Plus (Takara, Japan) 1 mL를 분주하여 바닥에서 떼어냈다. 상층액과 세포가 용해된 RNAiso Plus 용액은 분석 전까지 -80°C에서 보관하였다. 위 세포 배양 과정은 **Figure 5-1**에 나타내었다.

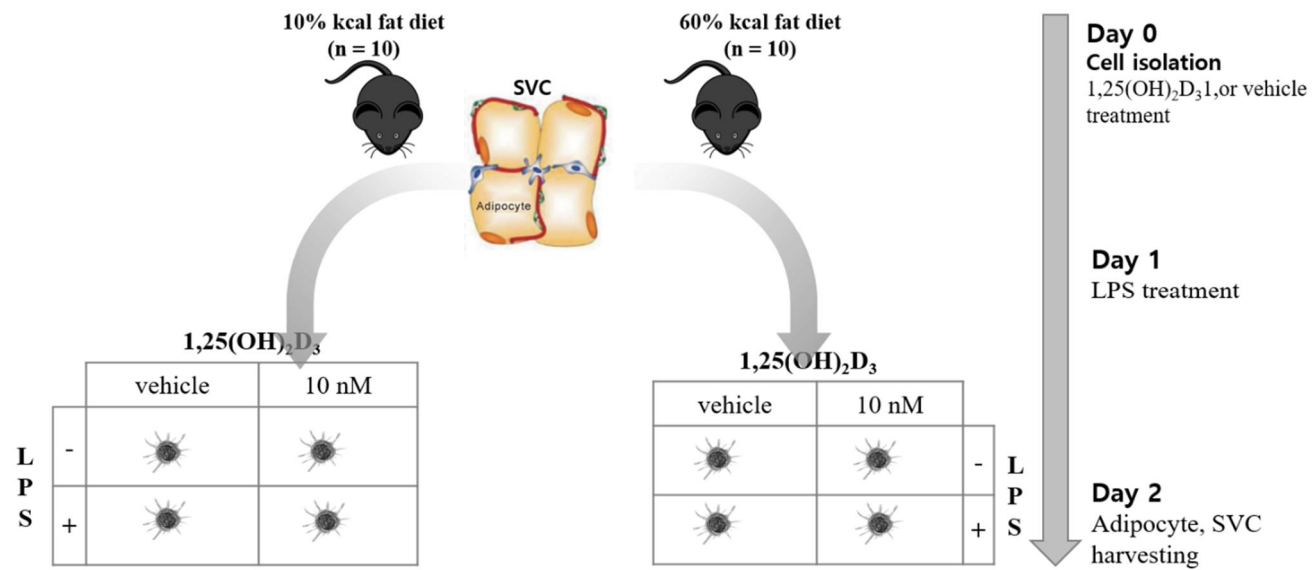


Figure 5-1. The experimental design and cell culture process

5.2.6. 세포 배양액에서 MCP-1 단백질 농도 측정

SVC의 배양액 및 지방세포의 배양액에서 효소면역측정법을 이용한 Mouse MCP-1 ELISA set (BD Bioscience, USA)를 이용하여 MCP-1의 단백질 농도를 측정하였다. Anti-mouse MCP-1 antibody를 0.2M의 sodium phosphate에 1:250의 비율로 희석하여 ELISA용 96-well plate에 분주한 뒤 4℃에서 16시간 동안 정치했다. 300 μ L의 PBS(0.05% Tween-20)용액으로 세 번 워싱한 뒤 200 μ L의 assay diluent(BD Pharmingen, USA)을 분주한 뒤 한 시간 정치했다. 위의 방법으로 워싱 한 뒤 100 μ L의 배양액을 분주하고 2시간 반응시켰다. 다시 5번 워싱하고 HRP-anti mouse MCP-1을 assay diluent에 1:250으로 희석한 용액을 100 μ L씩 분주하고 한 시간 정치하였다. 7번 워싱하고, 100 μ L의 Substrate solution을 분주한 뒤 암실에서 30분 정치하였다. 이후 50 μ L의 H₃PO₄ (1 M)을 추가해준 뒤 분광광도계(Spectramax 190, USA)를 이용하여 450 nm에서 파장을 측정하였다. 표준 시료의 흡광도 값을 기준으로 표준곡선을 그려 배양액의 MCP-1 농도를 계산하였다. 지방세포 배양액의 MCP-1 농도는 지방세포에서 DNA를 추출하여 그 값으로 보정하였다. DNA의 추출은 Quick-DNA™ Miniprep Plus kit (Zymo research, Irvine, CA, USA)를 이용하였다.

5.2.7. 세포 배양액에서 IL-6, IL-1 β , TNF- α 단백질 농도 측정

SVC의 배양액 및 지방세포의 배양액에서 효소면역측정법을 이용한 각각의 Mouse IL-6, IL-1 β , TNF- α ELISA set (BD Bioscience, USA)를 이용하여 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 단백질 농도를 측정하였다. IL-6와 IL-1 β 는 각각의 anti-mouse antibody를 0.1M의 sodium carbonate에 1:250으로 희석하고, TNF- α 는 antibody를 0.2M의 sodium phosphate에 1:250의 비율로 희석한 뒤 ELISA용 96-well plate에 분주하여 4℃에서 16시간 동안

정치했다. 이 후 측정 과정은 앞에 기술한 MCP-1의 측정과 동일하며, 마찬가지로 표준 시료의 흡광도 값을 기준으로 표준곡선을 그려 배양액의 IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 농도를 계산하였다. 지방세포 배양액의 IL-6, IL-1 β , TNF- α 농도는 지방세포에서 DNA를 추출하여 그 값으로 보정하였다.

5.2.8. SVC에서 RNA 추출, cDNA 합성 및 real-time PCR 분석

1) RNA 추출

회수한 SVC에서 RNAiso Plus (Takara, Japan)를 이용하여 RNA를 추출하였다. 강하게 vortexing한 후 200 μ L의 chloroform (Sigma Aldrich, USA)을 분주한 뒤 다시 강하게 섞어주었다. 12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 15분간 원심분리 한 뒤, 상층액을 새 tube에 옮겨 담고 500 μ L의 isopronaol (Sigma Aldrich, USA)을 넣어 5분간 vortexing한 후 상온에 5분 동안 두었다가, 12,000 \times g, 4 $^{\circ}$ C 조건에서 15분간 원심분리하였다. 75% ethanol로 pellet을 씻어주고 건조시킨 뒤, 0.05% DEPC-treated DW 10 μ L에 용해시켰다. UV용 96-well plate (Corning, USA)와 분광광도계(Spectramax 190)를 이용하여 260, 280 nm에서 파장을 측정하여 RNA의 농도와 순도를 확인하였다.

2) cDNA 합성

PrimeScriptTM 1st strand cDNA synthesis kit (Takara, Japan)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 다양한 농도의 RNA stock을 RNA 2 ng에 해당하는 부피를 넣고, RNase free DW로 부피를 조절하였다. 이어 dNTP Mixture (10 mM each) 1 μ L, Oligo dT Primer (50 μ M) 1 μ L를 넣어 총 10 μ L의 RNA-primer mixture를 만들었다. 이후 65 $^{\circ}$ C 및 4 $^{\circ}$ C 조건에서 각각 5분 동안 정치 한 뒤 5 X PrimeScript Buffer 4 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 0.5

μL , PrimeScript RTase (200 U/ μL) 1 μL , RNase free DW 4.5 μL 를 추가하여 총 20 μL 의 reaction mixture를 만들었다. 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA)로 42°C에서 50분, 95°C에서 5분, 4°C에서 30분 동안 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA는 분석 전까지 -20°C 조건으로 보관하였다.

3) Real-time PCR

합성한 cDNA를 10배 희석한 뒤, 8-tube strip (0.2 mL)에 cDNA 1 μL , DW 7.8 μL , SYBR Premix Ex Taq (2X) 10 μL , ROX reference dye (50X) 0.4 μL , forward 및 reverse primer 각각 0.4 μL 씩 분주하였다. StepOne™ Real-time PCR system (Applied Biosystems, USA)을 이용하여 반응시켰다. 모든 실험은 duplicate으로 분석하여 평균값을 얻었고, house-keeping 유전자인 *Gadph*의 발현량으로 보정하였다. 더불어 모든 유전자의 발현량은 대조군의 발현량을 기준으로 하여 상대정량 하였다. 각 유전자 별 primer 염기 서열은 Table 5-4에 나타내었다.

5.2.9. 통계 분석방법

모든 통계분석은 SPSS Statistics version 23 software (IBM SPSS Statistics, USA)을 사용하여 수행되었다. 식이 중 지방 함량 혹은 비타민 D 섭취량에 의한 효과를 확인하기 위해서는 이원배치 분산분석 (Two-way ANOVA)를 수행하였다. 분산분석 결과가 유의적일 경우, Fisher's LSD 검정으로 사후검정 하였다.

식이 중 비타민 D의 함량을 달리하지 않은 CON군과 HFD군의 식이 중 지방 함량에 의한 효과를 비교하기 위해서는 독립 t 검정을 실시하였다. 동일한 개체의 조직에서 분리한 세포에 *in vitro*로 1,25(OH)₂D₃를 처리한 효과를 확인하기 위해서는 대응표본 t 검정(paired t -test)을 실시하였다. 모든 결과는 평균 \pm 표준오차 (means \pm SEM)로

표기되었으며, 통계 검증은 $P < 0.05$ 수준에서 이루어졌다.

Table 5-4. Primer sequences used in real-time PCR

Gene ¹	Forward primer	Reverse primer
<i>Tlr2</i>	GGCAGGGATGACAGACGGTA	AAGGAGGGCACC GCAGAAT
<i>Tlr4</i>	GATGTGCCCTTGGCTTTGTA	TGCTCTTCTCTCTGGTTGTTTTTC
<i>Dusp1</i>	TGTGGGAGCATTTAGAGAGACTG	CCAAAACGACAGCCAAAAGT
<i>Dusp10</i>	CCAAGGAGTTGTTTCCGTTAGC	AGTGGAGCAGGTGAAGAGTGA
<i>Gapdh</i>	GGAGAAACCTGCCAAGTA	AAGAGTGGGAGTTGCTGTTG

¹ *Tlr2*, toll like receptor 2; *Tlr4*, toll like receptor 4; *Dusp1*, dual specificity protein phosphatase 1; *Dusp10*, Dual specificity protein phosphatase 10; *Gapdh*, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

5.3. 연구결과

5.3.1. 체중, 체지방량 변화 및 혈액 지표

체중, 백색 지방량, 식이 섭취량 결과를 **Table 5-5**에 제시하였다. 초기 체중은 군 간에 유의적인 차이가 없었으나, 13주 후 체중은 HFD군이 CON군보다 36.3% 더 높았다 ($P < 0.001$). 평균 식이 섭취량 (g/day)은 고지방식이 섭취 혹은 비타민 D 섭취 정도에 따라 영향을 받지 않았다. 혈청 25(OH)D 농도는 DS군이 DC군에 비해 148% 높았으며, DS군에서는 CON군에 비해 HFD군의 25(OH)D 농도가 11% 낮았다 ($P = 0.002$).

Table 5-5. Body weight, weight gain, body fat, and dietary intake of mice in the CON_DC, CON_DS, HFD_DC and HFD_DS groups¹

	CON		HFD		<i>P</i> -value		
	CON_DC (n=12)	CON_DS (n=8)	HFD_DC (n=11)	HFD_DS (n=8)	Fat amount	Vitamin D content	Interaction
Body wt. at 0 week (g)	18.6 ±0.5	18.8 ±0.4	18.6 ±0.4	18.5 ±0.3	0.804	0.941	0.652
Body wt. at 13 week (g)	30.1 ±0.7 ^a	29.2 ±0.9 ^a	40.2 ±1.4 ^b	40.7 ±1.2 ^b	< 0.001	0.843	0.573
Weight gain (g)	11.5 ±0.5 ^a	10.4 ±0.9 ^a	22.0 ±1.0 ^b	22.5 ±1.2 ^b	< 0.001	0.730	0.381
White adipose tissue wt.² (g)	1.89 ±0.16 ^a	1.76 ±0.21 ^a	5.51±0.28 ^b	5.28 ±0.27 ^b	< 0.001	0.909	0.682
Daily food intake (g/day)	2.74 ±0.04 ^c	2.65 ±0.02 ^b	2.54 ±0.01 ^a	2.65 ±0.02 ^b	0.001	0.557	0.001
Serum 25(OH)D (ng/mL)	37.1±1.7 ^a	93.9 ±2.9 ^c	34.5±1.1 ^a	83.4 ±2.3 ^b	0.005	< 0.001	0.073

¹Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. The data are presented as means ± SEM

CON_DC: 10% kcal fat diet + vitamin D control; CON_DS: 10% kcal fat diet + vitamin D supplement; HFD_DC: 45% kcal fat diet + vitamin D control; HFD_DS: 45% kcal diet + vitamin D supplement.

²White adipose tissue weight included epididymal, subcutaneous, retroperitoneum, and perinephric fat.

5.3.2. 지방조직의 SVC중 면역세포의 분포

고지방식이와 비타민 D의 섭취가 지방조직 내 면역세포의 분포에 영향을 미치는지를 확인하기 위해 내장지방조직에서 SVC를 분리한 뒤, FACS 분석을 통해 조혈모 세포에서 발현되는 CD45 positive한 세포를 선택하고, 그 중에서 대식세포 (CD11b⁺F4/80⁺cells), NK 세포 (NK1.1⁺CD3⁻cells), CD 4 T세포 (CD3⁺ CD4⁺), CD 8 T 세포 (CD3⁺ CD8⁺), B 세포 (CD19⁺CD3⁺ cells)의 비율과 수를 확인하였다. **Figure 5-2**에 지방조직 g당 각 세포의 수를 나타내었으며, **Table 5-6**에 총 세포의 수를 나타내었다.

지방조직 1 g 당 SVC의 수 및 총 SVC의 수는 HFD군에서 CON군에 비해 유의적으로 높았다. FACS 분석을 통해 SVC 중 면역세포의 비율을 구하였는데, 1 g 당 SVC수에 각 면역세포의 비율을 곱하여 내장지방조직 g 당 면역세포의 수를 계산하였다. 지방조직 g당 CD45 positive 세포의 수는 CON군에 비해 HFD군에서 높은 경향을 보였으나 ($P = 0.054$), CD45 positive 총 세포의 수는 HFD군에서 유의적으로 317% 높았다.

대식세포의 수 (numbers/g, total number)는 CON군에 비해 HFD군의 지방조직에서 유의적으로 높았다 ($P < 0.001$). 비타민 D를 보충한 DS군의 대식세포의 수(numbers/g, total number)의 평균값은 DC군의 값에 비해 낮았으나, 유의적인 차이는 보이지 않았다. NK세포의 수(numbers/g, total number)도 CON군에 비해 HFD군에서 유의적으로 높았으나, 비타민 D 보충에 의한 유의적인 변화는 보이지 않았다. 지방조직 g당 B 세포, CD4 T세포, CD8 T세포의 수 (numbers/g)은 고지방식이 섭취에 의한 변화는 없었다. 하지만 총 세포의 수를 통계처리 한 결과, CD4 T세포와 CD8 T세포의 수는 CON군에 비해 HFD군에서 유의적으로 높았다. CD4 T세포의 수(numbers/g, total number)는 비타민 D 섭취군(DS)에서 낮은 경향성을 보였다 (numbers/g, $P = 0.057$; total number, $P = 0.091$).

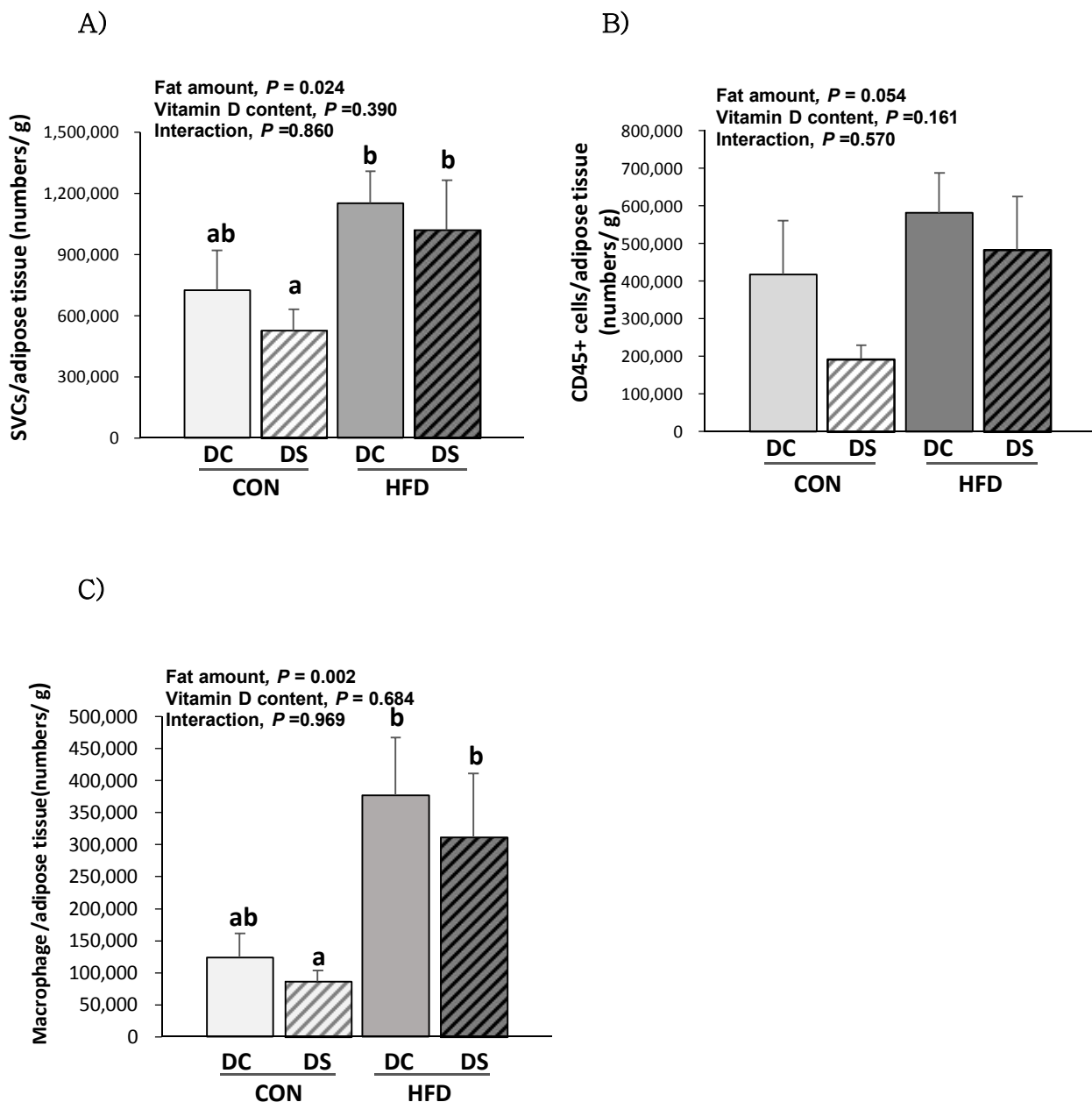
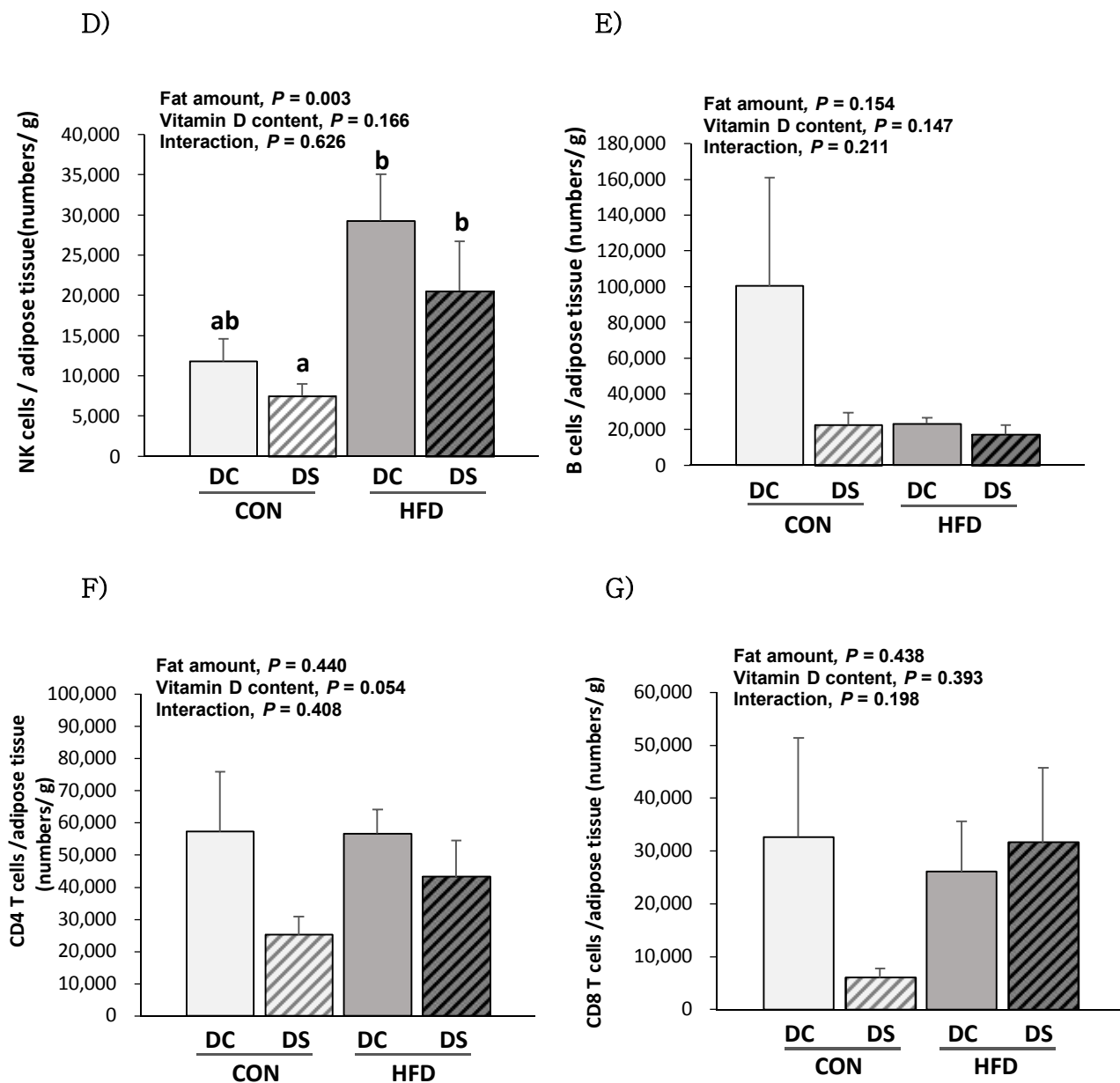


Figure 5-2. Cell numbers per gram of visceral adipose tissue. (A) Stromal vascular cell (B) CD45 positive cell (C) Macrophage

Data are presented as mean \pm SEM, $n = 5\sim6$ for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ab Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON_DC: 10% kcal fat diet + vitamin D control; CON_DS: 10% kcal fat diet + vitamin D supplement; HFD_DC: 45% kcal fat diet + vitamin D control; HFD_DS: 45% kcal diet + vitamin D supplement.



**Figure 5-2. Cell numbers per gram of visceral adipose tissue (continued).
(D) NK cell (E) B cell (F) CD4 T cell (G) CD8 T cell**

Data are presented as mean \pm SEM, $n = 5\sim6$ for each group. Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. CON_DC: 10% kcal fat diet + vitamin D control; CON_DS: 10% kcal fat diet + vitamin D supplement; HFD_DC: 45% kcal fat diet + vitamin D control; HFD_DS: 45% kcal diet + vitamin D supplement.

Table 5-6. Weights of visceral fat tissue and total cell numbers of (A) Stromal vascular cell (B) CD45 positive cell (C) Macrophage (D) NK cell (E) B cell (F) CD4 T cell (G) CD8 T cell^{1,2} in visceral adipose tissue^{1,2}

	CON		HFD		<i>P</i> -value		
	DC (n=5)	DS (n=5)	DC (n=6)	DS (n=6)	Fat amount	Vitamin D content	Interaction
Visceral fat weights ³ (g)	0.97 ±0.09 ^a	0.86 ±0.15 ^a	2.02±0.01 ^b	2.01 ±0.01 ^b	< 0.001	0.486	0.546
Stromal vascular cell	558,650 ±126,680 ^a	386,800 ±122,341 ^a	2,093,625 ±277,413 ^b	1,845,208 ±435,608 ^b	< 0.001	0.487	0.899
CD45 positive cell	321,313±100,559 ^a	141,760 ±43,440 ^a	1,057,855 ±176,466 ^b	874,074 ±231,035 ^b	< 0.001	0.294	0.990
Macrophage	93,574 ±20,182 ^a	63,969 ±20,780 ^a	686,589 ±149,729 ^b	534,077 ±141,837 ^b	< 0.001	0.438	0.599
NK cell	9,042 ±1,557 ^a	5,656 ±1,787 ^a	53,078±9,462 ^b	37,213 ±10,061 ^b	< 0.001	0.909	0.682
B cell	76,498 ±46,504	15,064 ±3,908	42,188 ±4,978	31,227 ±8,314	0.681	0.113	0.261
CD4 T cell	44,110±12,968 ^{ab}	19,166±6,766 ^a	102,932±12,000 ^c	78,041±18,561 ^b	0.001	0.091	0.993
CD8 T cell1	25,505±14,113 ^{ab}	4,663 ±1,888 ^a	47,306±15,476 ^{ab}	57,154 ±23,131 ^b	0.039	0.745	0.369

¹Two-way ANOVA was used to determine the significant effects of fat and vitamin D contents, and an interaction. ^{ab}Different superscripts indicate significant difference ($P < 0.05$) by Fisher's LSD multiple comparison test. The data are presented as means ± SEM.

²CON_DC: 10% kcal fat diet + vitamin D control; CON_DS: 10% kcal fat diet + vitamin D supplement; HFD_DC: 45% kcal fat diet + vitamin D control; HFD_DS: 45% kcal diet + vitamin D supplement.

³Visceral adipose tissue weight included epididymal, retroperitoneum, and perinephric fat.

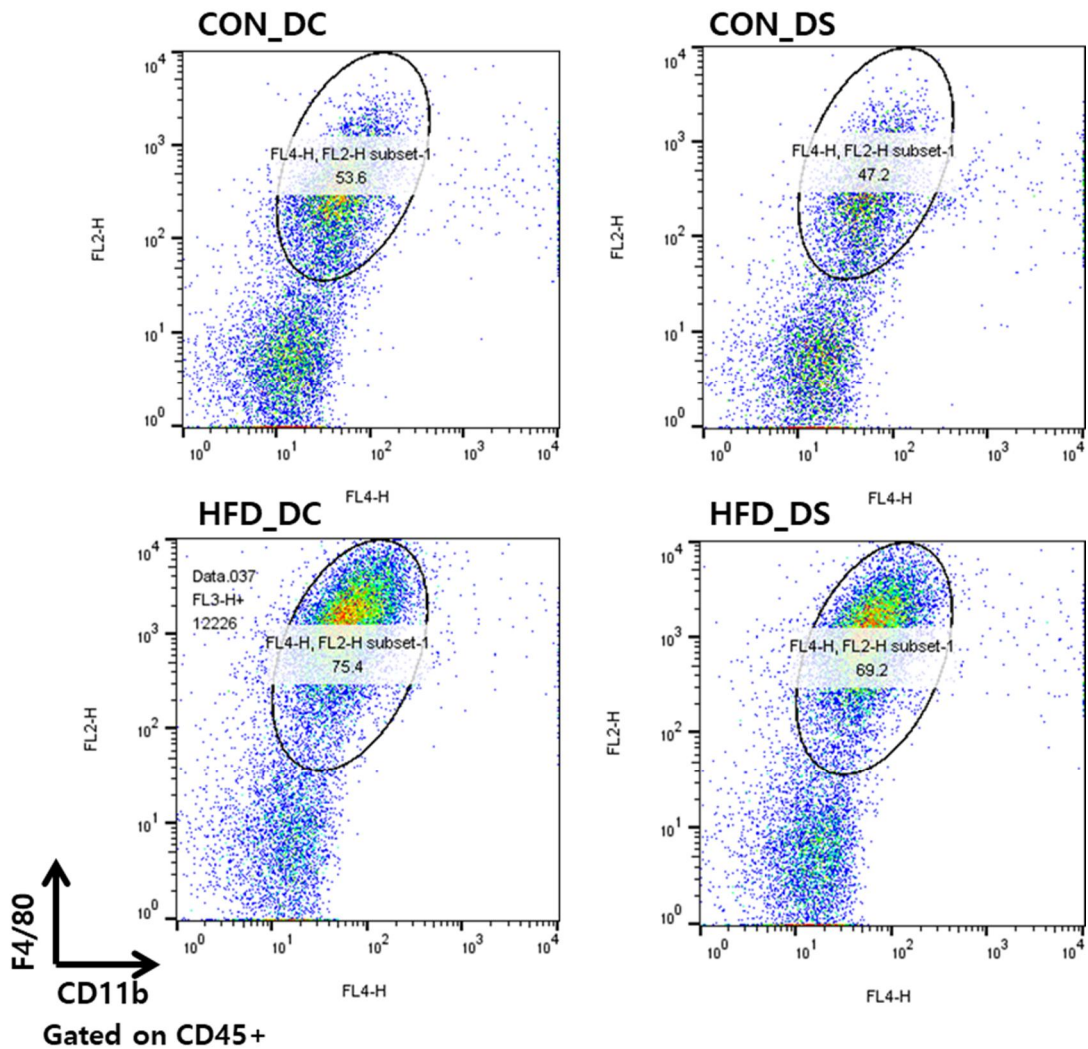


Figure 5-3. Flow cytometric dot plots of macrophage from visceral adipose tissue

CD45⁺F4/80⁺ CD11b⁺ cells were presented as dot plots of the FlowJo analyses. CON_DC: 10% kcal fat diet + vitamin D control; CON_DS: 10% kcal fat diet + vitamin D supplement; HFD_DC: 45% kcal fat diet + vitamin D control; HFD_DS: 45% kcal diet + vitamin D supplement

5.3.3. 체중, 체지방량 변화 및 혈액 지표

지방조직에서 지방세포와 SVC를 분리한 CON군과 HFD군의 체중, 체지방량, 식이섭취량 결과를 **Table 5-7**에 제시하였다. 초기 체중은 CON군과 HFD군 사이에 유의적인 차이가 없었으나, 11주 체중은 HFD군이 CON군보다 38% 더 높았고 ($P < 0.001$), 백색지방량은 HFD군이 CON군보다 123% 더 높았다 ($P < 0.001$). 평균 에너지 섭취량은 CON군에 비해 HFD군이 19% 높았다 ($P < 0.001$).

Table 5-7. Body weight, weight gain, body fat, and dietary intake of mice in the CON and HFD groups

	CON (n = 9)	HFD (n = 10)	<i>P</i> value ²
Body weight at 0 week (g)	19.8 ± 0.3	19.9 ± 1.1	0.885
Body weight at 11 week (g)	30.9 ± 0.6	42.7 ± 1.2	< 0.001
WAT weight ² (g)	2.48 ± 0.12	5.55 ± 0.21	< 0.001
Average dietary intake (g/day)	2.68 ± 0.04	2.33 ± 0.04	< 0.001
Average energy intake (kcal/day)	10.3 ± 0.2	12.2 ± 0.2	< 0.001

¹ The data are presented as means ± SEM, Student's *t* test was used to determine the significant effect of obesity (*P* < 0.05). CON: 10% kcal fat diet; HFD: 60% kcal fat diet.

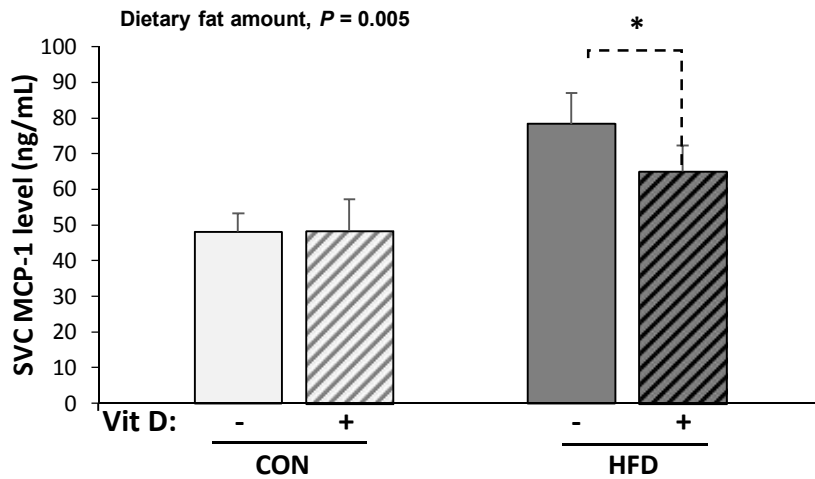
² WAT includes perirenal, intraperitoneal, epididymal, and subcutaneous fat.

5.3.4. SVC 배양액의 염증성 사이토카인 농도

활성형의 비타민 D가 지방조직의 염증 반응을 저하시키는 기전을 지방조직을 구성하고 있는 세포 별로 확인하기 위하여, 부고환 지방조직에서 SVC와 지방세포를 분리한 뒤 *in vitro*로 1,25(OH)₂D₃ (0 또는 10 nM)를 처리하고 LPS로 자극시켰다. SVC에서 분비한 케모카인 및 사이토카인의 농도를 확인하기 위해 SVC를 배양한 배지를 회수하여 MCP-1, IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 농도를 측정하였다 (Figure 5-3, 5-4).

MCP-1, IL-6, IL-1 β 의 단백질 농도는 CON군에 비해 HFD군의 마우스에서 분리한 SVC의 세포 배양액에서 유의적으로 높았다. HFD군에서 분리한 SVC에 1,25(OH)₂D₃를 처리한 결과 MCP-1, IL-6, IL-1 β 의 생성이 유의적으로 감소하였다 (각각 15%, 12%, 34%). CON군에서 분리한 SVC에서는 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 IL-6가 감소하였다 ($P = 0.018$). TNF- α 의 농도는 CON군과 HFD군 사이의 차이가 없었으며, 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의한 유의적인 변화도 관찰되지 않았다.

A)



B)

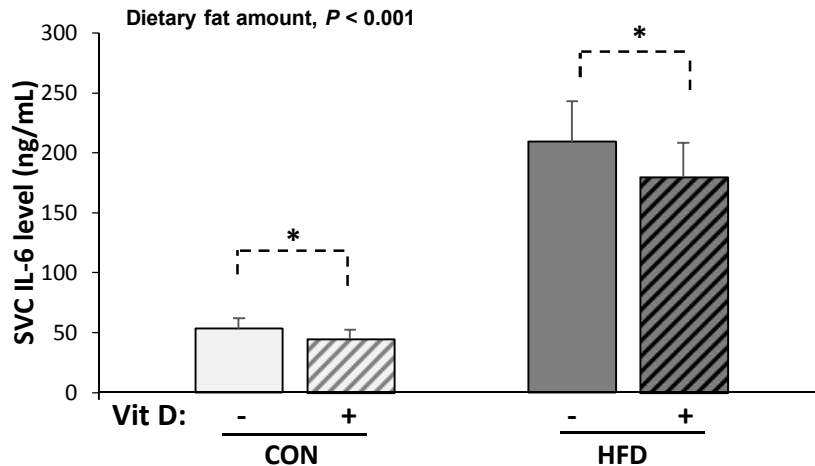
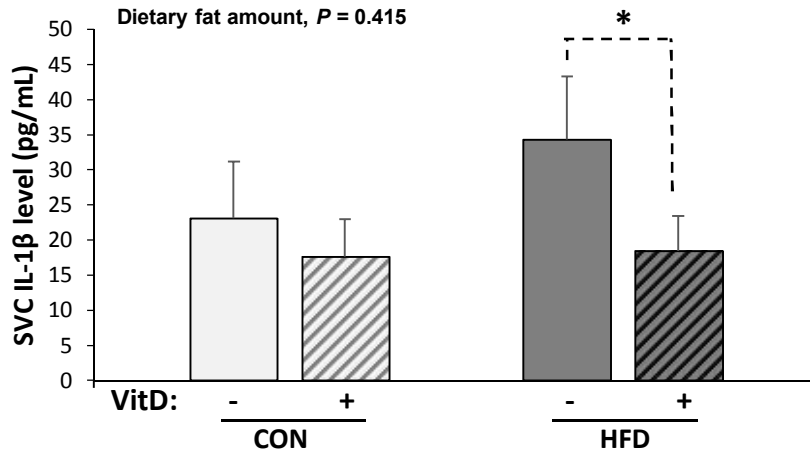


Figure 5-4. MCP-1 and IL-6 production levels (ng/mL) in Stromal vascular cells from CON and HFD mice

Visceral adipose tissues were collected from CON and HFD mice and SVCs were isolated using collagenase digestion. SVCs were treated with vehicle (0.1% ethanol) or 1,25(OH)₂D₃ (10 nM) for 24 h before being stimulated with LPS (0.1 µg/ml) for another 24 hr. Culture medium was collected and analyzed for MCP-1 and IL-6 using ELISA and. Production of MCP-1 (A), IL-6 (B). Data are presented as mean ± SEM, n = 9~10 for each group. Paired t-test was used to determine the significant effects of *in vitro* 1,25(OH)₂D₃ treatment. * indicate significant difference ($P < 0.05$). Student's t test was used to determine the significant effects of dietary fat intake. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 60% kcal fat diet.

A)



B)

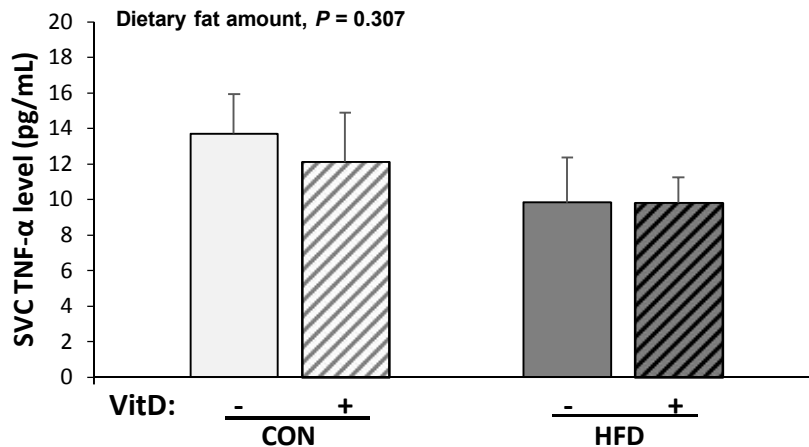


Figure 5-5. IL-1 β and TNF- α production levels (pg/mL) in Stromal vascular cells from CON and HFD mice

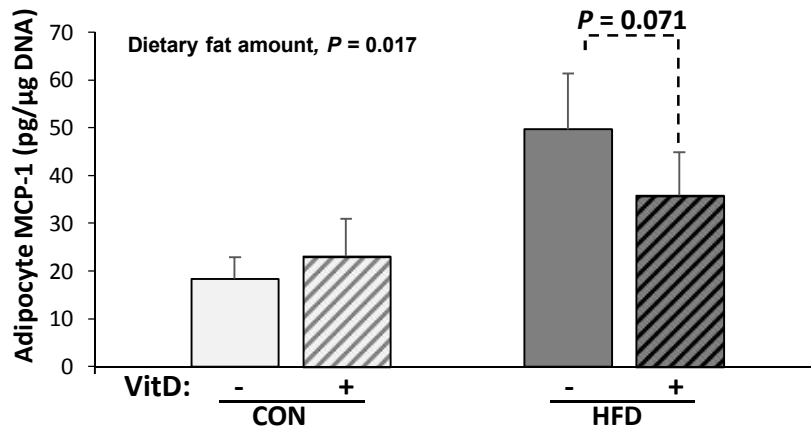
Visceral adipose tissues were collected from CON and HFD mice and SVCs were isolated using collagenase digestion. SVCs were treated with vehicle (0.1% ethanol) or 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10 nM) for 24 h before being stimulated with LPS (0.1 μ g/ml) for another 24 hr. Culture medium was collected and analyzed for IL-1 β and TNF- α using ELISA and. Production of IL-1 β (A), TNF- α (B). Data are presented as mean \pm SEM, $n = 9\sim 10$ for each group. Paired t-test was used to determine the significant effects of *in vitro* 1,25(OH) $_2$ D $_3$ treatment. * indicate significant difference ($P < 0.05$). Student's t test was used to determine the significant effects of dietary fat intake. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 60% kcal fat diet.

5.3.5. 지방세포 배양액의 염증성 사이토카인 농도

In vitro 상의 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리가 비만마우스와 대조마우스의 지방조직 내 지방세포에서 생성되는 케모카인과 염증성 사이토카인에 미치는 영향을 확인하기 위하여, CON와 HFD군의 마우스의 부고환 지방조직에서 지방세포를 분리하고 SVC와 마찬가지로 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 처리하고(0 혹은 10 nM) LPS로 자극시켰다. 이후 회수한 지방세포의 배양액에서 MCP-1, IL-6, IL-1 β , TNF- α 의 농도를 측정하였다 (Figure 5-5, 5-6). 각각의 농도는 지방세포의 DNA양으로 보정하였다.

HFD군의 지방조직에서 분리한 지방세포에서 CON군의 지방세포에 비해 유의적으로 더 많은 MCP-1와 IL-6을 분비하는 것이 확인되었다. 하지만 IL-1 β 는 반대로 CON의 지방세포에서 유의적으로 더 많은 양이 생성되었다. HFD군의 지방세포에 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 를 처리한 결과 MCP-1의 생성이 감소되는 경향성이 나타났으나 ($P = 0.071$), IL-6, IL-1 β 그리고 TNF- α 의 농도는 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의해 유의적으로 변화가 나타나지 않았다. CON군의 지방세포는 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의한 염증성 사이토카인의 농도차이가 관찰되지 않았다.

A)



B)

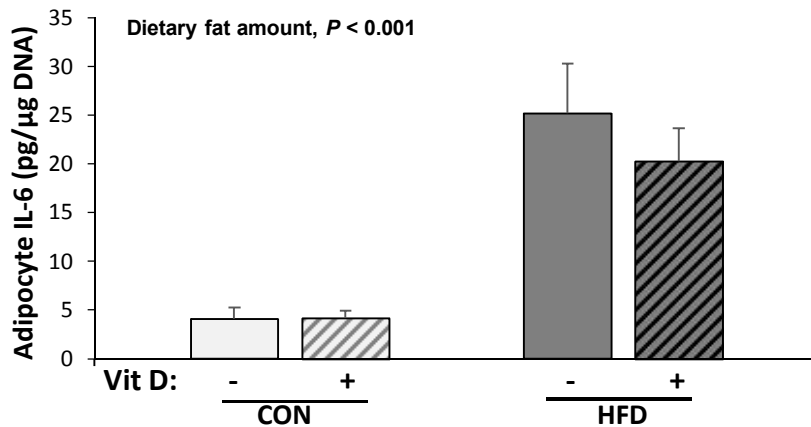
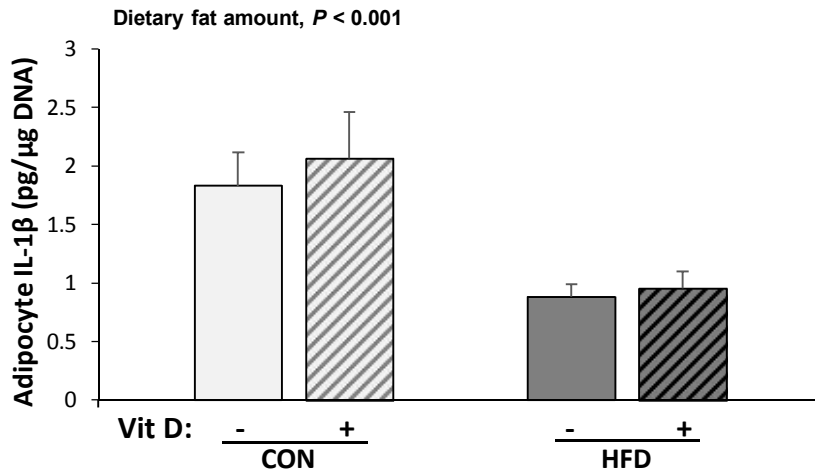


Figure 5-6. MCP-1 and IL-6 production levels (pg/ μg DNA) in adipocytes from CON and HFD mice

Visceral adipose tissues were collected from CON and HFD mice and adipocytes were isolated using collagenase digestion. Adipocytes were treated with vehicle (0.1% ethanol) or 1,25(OH)₂D₃ (10 nM) for 24 h before being stimulated with LPS (0.1 μg/ml) for another 24 hr. Culture medium was collected and analyzed for MCP-1 and IL-6 using ELISA and. Production of MCP-1 (A), IL-6 (B) was normalized with total cellular DNA. Data are presented as mean ± SEM, n = 9~10 for each group. Paired t-test was used to determine the significant effects of *in vitro* 1,25(OH)₂D₃ treatment. * indicate significant difference ($P < 0.05$). Student's t test was used to determine the significant effects of dietary fat intake. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 60% kcal fat diet.

A)



B)

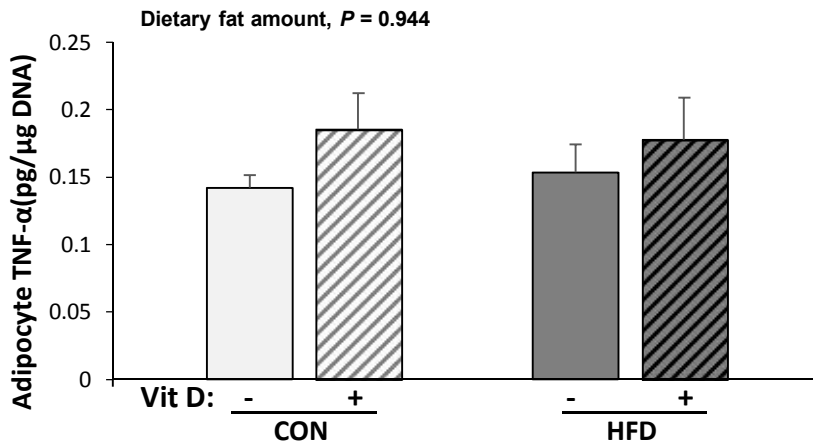


Figure 5-

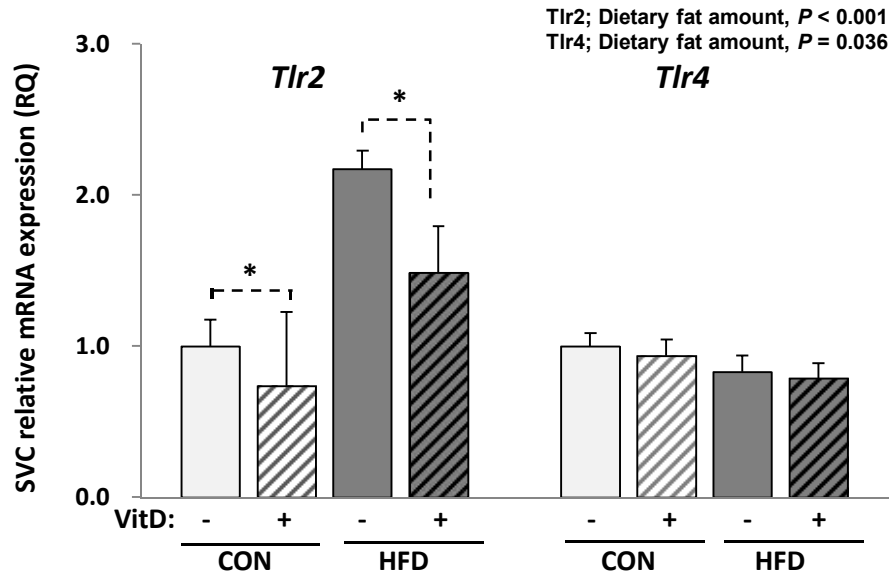
7. IL-1 β and TNF- α production levels (pg/ μ g DNA) in adipocytes from CON and HFD mice

Visceral adipose tissues were collected from CON and HFD mice and adipocytes were isolated using collagenase digestion. Adipocytes were treated with vehicle (0.1% ethanol) or 1,25(OH) $_2$ D $_3$ (10 nM) for 24 h before being stimulated with LPS (0.1 μ g/ml) for another 24 hr. Culture medium was collected and analyzed for IL-1 β and TNF- α using ELISA and. Production of IL-1 β (A), TNF- α (B) was normalized with total cellular DNA. Data are presented as mean \pm SEM, $n = 9\sim 10$ for each group. Paired t-test was used to determine the significant effects of *in vitro* 1,25(OH) $_2$ D $_3$ treatment. * indicate significant difference ($P < 0.05$). Student's t test was used to determine the significant effects of dietary fat intake. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 60% kcal fat diet.

5.3.6. SVC에서의 염증관련 유전자의 발현량

고지방식이 섭취로 유도한 비만과 *in vitro* 상의 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리가 SVC의 *Tlr2*, *Tlr4*, *Dusp1*, *Dusp10* 발현에 미치는 영향을 확인하였다 (Figure 5-7). 그 결과 SVC의 *Tlr2* mRNA 발현은 고지방식이를 섭취한 HFD군에서 CON군에 비해 높은 값을 보였으며, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의해 유의적으로 감소하였다. CON군에서 분리한 SVC의 경우 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의해 *Tlr2*의 발현이 25% 낮아졌고, HFD군의 경우 28% 낮아졌다. 반면 *Tlr4*의 발현은 고지방식이 섭취나 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의한 유의적인 차이가 없었다. SVC의 *Dusp1* mRNA 수준은 HFD군과 CON군 사이의 차이는 없었으나, CON군에서는 $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의해 유의적으로 증가하였고, HFD군에서는 증가 경향성을 보였다 ($P = 0.081$). SVC의 *Dusp10* mRNA 수준은 CON군에 비해 HFD군에서 유의적으로 낮았으나, $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 처리에 의한 차이는 관찰되지 않았다.

A)



B)

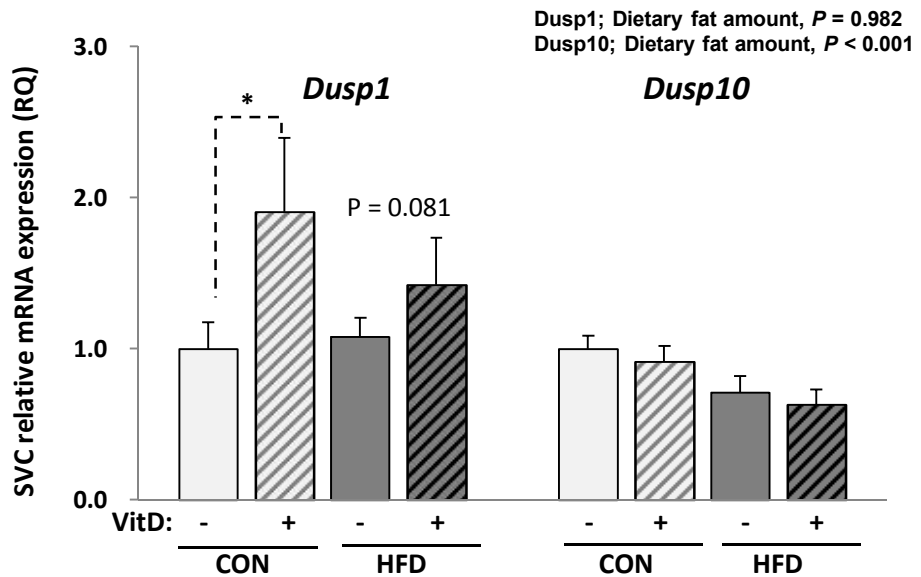


Figure 5-8. The mRNA levels of genes involved in inflammation in SVCs

Data are presented as mean \pm SEM, $n = 9\sim 10$ for each group. Paired t-test was used to determine the significant effects of *in vitro* 1,25(OH) $_2$ D $_3$ treatment. * indicate significant difference ($P < 0.05$). Student's t test was used to determine the significant effects of dietary fat intake. CON: 10% kcal fat diet; HFD: 60% kcal fat diet. *Tlr2*, toll like receptor 2; *Tlr4*, toll like receptor 4; *Dusp1*, dual specificity

protein phosphatase 1; *Dusp10*, Dual specificity protein phosphatase 10.

5.4. 고찰

앞선 연구를 통하여 비타민 D의 보충섭취가 비만마우스와 대조마우스의 지방조직에서 염증과 관계된 유전자의 발현 수준을 낮추는 것을 확인하였다. 지방조직은 지방세포 외에 면역세포를 포함한 SVC로 구성되어 있으며, 비만은 지방조직으로의 면역세포의 침윤을 증가시킨다고 보고되었다. 따라서 본 연구에서는 비타민 D의 섭취가 비만 마우스에서 증가된 면역세포의 비율에 영향을 미치는지 확인하고, 비타민 D가 지방조직 내 어떤 세포에 작용하여 지방조직의 염증반응을 완화시키는지 확인하고자 하였다. 이미 지방세포 혹은 면역세포에 *in vitro* 1,25(OH)₂D 처리가 염증성 사이토카인의 분비에 미치는 영향을 확인한 연구들이 있지만, 대부분의 연구들이 cell line을 이용하였다. 하지만 본 연구는 고지방식으로 비만을 유도한 마우스의 지방조직에서 세포를 분리하여 세포별로 1,25(OH)₂D의 효과를 확인하였을 뿐 아니라 이를 대조마우스의 세포와 비교하였다는 점에서 의미가 있다.

본 연구에서는 마우스의 지방조직에서 분리한 SVC와 지방세포에 10 nM (4 ng/mL)의 농도로 1,25(OH)₂D를 처리하였다. 지방조직을 구성하는 지방세포와 대식세포에 작용하는 비타민 D의 형태는 1,25(OH)₂D인데, 혈액의 1,25(OH)₂D가 직접 세포막의 mVDR과 결합하기도 하고, 혈액의 25(OH)D가 세포 내로 유입되어 hydroxylation되어 이용되기도 한다(Chun *et al.* 2008, Abbas 2017). 식이 kg 당 25,000 IU의 비타민 D₃을 보충한 경우 혈액의 25(OH)D농도는 60~80 ng/mL이며, 1,25(OH)₂D 농도는 150~180 pg/mL이다. 혈액의 25(OH)D와 1,25(OH)₂D가 모두 지방조직을 구성하는 세포에 작용하는 것을 고려할 때 처리 가능한 1,25(OH)₂D의 농도는 0.2~80 ng/mL이다. 세포에서 비타민 D의 효과를 확인한 대부분의 선행연구는 1, 10, 혹은 100 nM (0.4, 4, 40 ng/mL)의 1,25(OH)₂D를 처리하였다(Lira *et al.* 2011, Lorente-Cebrian *et al.* 2012, Marcotorchino *et al.* 2012). Zhang 등(2012)의 연구에 의하면 사람의 단핵구에서 생성되는 사이토카인의 발현이 1,25(OH)₂D 농도에 반비례하며, LPS에 의해 자극된

사이토카인의 발현이 10 nM의 1,25(OH)₂D 처리에 의해 유의적으로 감소되었다. 뿐만 아니라 지방조직의 1,25(OH)₂D 농도는 혈액의 7.6배라고 보고된 선행연구가 있으므로(Rungby *et al.* 1993), 이에 근거하여 본 연구에서는 세포에 10 nM (4 ng/mL)의 1,25(OH)₂D를 처리하였다.

세포 배양액을 분석한 결과, 대조마우스의 SVC 보다 비만마우스의 SVC에서 MCP-1과 IL-6이 높은 농도로 분비되었으며, 지방세포도 비만마우스의 지방조직에서 유래한 경우 대조마우스 보다 유의적으로 더 많은 양의 MCP-1과 IL-6을 분비하였다. 비만은 지방세포의 크기를 증가시킬 뿐 아니라 지방세포에서 생성되는 MCP-1과 같은 케모카인의 분비를 증가시켜 면역세포가 지방조직에 침윤되도록 유도하는 것으로 알려져 있다(Tilg *et al.* 2006). 본 연구에서 SVC의 면역세포 분포를 확인한 결과에 의하면, 비만마우스의 지방조직 내 SVC의 수(numbers/g, total number)가 대조군에 비해 유의적으로 높았으며, 비만에서 그 수가 증가하여 염증성 사이토카인을 분비하는 것으로 알려진 대식세포의 수(numbers/g)도 대조군의 3배 정도로 높았다. 선행연구에서도 비만마우스의 지방조직에 분포하는 대식세포의 비율이 면역세포의 50% 정도이며, 이는 대조군의 5배 수준이라고 보고된 바 있다(Weisberg *et al.* 2003). 따라서 비만마우스의 지방세포에서 증가된 MCP-1의 분비가 지방조직 내 SVC의 비율을 증가시켰으며, SVC 중에서도 대식세포와 NK 세포의 비율을 증가시킴으로써 염증성 사이토카인의 수준을 높인 것으로 사료된다.

또한 비만으로 인한 염증성 사이토카인 생성 기전에 관계된 유전자의 발현을 확인한 결과, SVC의 *Tlr2* mRNA 발현수준은 대조마우스에 비해 비만마우스에서 117% 높았다 ($P = 0.002$). 하지만 *Tlr4* mRNA 발현은 전반적으로 비만마우스에서 17% 정도 낮아졌다. TLR은 세포막에 존재하며, 외부에서 기인한 병원성의 미생물 혹은 비만으로 야기된 유리지방산들과 결합한다. 이후 MyD88과 interleukin-1 receptor-associated factor kinase(IRAK)가 모여 TAK1을 활성화시켜 NF- κ B와

MAPK의 신호활성을 야기하며, 결과적으로 염증성 사이토카인의 발현이 증진된다(Uematsu *et al.* 2006). 비만한 사람 혹은 제2형 당뇨병이 있는 사람의 지방조직에서 TLR2의 단백질 수준이 증가한다고 보고된 바 있으며(Creely *et al.* 2007), 식이로 유도된 비만 마우스의 지방조직에서 높은 *Tlr2*의 mRNA 발현이 관측되었다(Shi *et al.* 2006). *Tlr2*의 경우 비만마우스의 SVC에서 발현이 증가되었으므로 선행연구와 유사한 결과를 보였으나, *Tlr4*는 선행연구와 달리 비만에 의해 증가하지 않았다. *Tlr4*는 *Tlr2*와 달리 LPS와 결합하여 신호를 전달하는 수용체인데, 본 실험에서 최종적으로 LPS로 세포를 자극하였기 때문에 비만에 의한 *Tlr4*의 증가가 관측되지 않았을 가능성이 있다.

HFD군의 마우스의 지방조직에서 분리한 SVC에 1,25(OH)₂D를 처리한 결과, 비만 마우스의 SVC에서 높은 농도를 보였던 MCP-1과 IL-6가 1,25(OH)₂D처리에 의해 감소하였다. 또한 비만 마우스에서 높은 발현을 보이는 않았으나 IL-1 β 의 농도도 1,25(OH)₂D처리에 의해 감소하였다. 이는 선행연구와 유사한 결과로써, 건강한 사람의 지방조직에서 분리한 pre-adipocyte에 10 혹은 100 nM의 1,25(OH)₂D를 처리하였을 때 MCP-1과 IL-6가 감소된다고 보고되었으며(Gao *et al.* 2013) 사람의 PBMC와 마우스의 골수유래대식세포에 1,25(OH)₂D를 농도 별로 처리하였을 때 IL-6의 분비가 1,25(OH)₂D 농도에 비례하여 감소한다고 알려졌다(Zhang *et al.* 2012). Gao 등(2013)은 pre-adipocyte가 SVC의 구성성분이며 대식세포와 비슷한 기능을 하기 때문에, 1,25(OH)₂D가 pre-adipocyte에 미치는 효과를 통해, 1,25(OH)₂D가 지방조직 내 SVC에 미치는 효과를 알 수 있을 것이라고 하였다. 하지만 본 연구는 실제 비만 마우스의 지방조직에서 SVC를 분리하여 1,25(OH)₂D의 효과를 확인하였으므로, 보다 더 직접적으로 SVC에서의 1,25(OH)₂D의 염증완화효과를 입증한 것으로 사료된다. CON군의 SVC는 *in vitro* 1,25(OH)₂D처리에 의해 유의적으로 IL-6만 15.2% 감소하였다. HFD군의 경우 대식세포의 비율이 SVC의 30%, 면역세포(CD45+ cell)의 72%를

차지한 반면, CON군의 경우 그 비율이 SVC의 17%, 면역세포의 34%를 차지하였으므로, ND군의 SVC 중 낮은 대식세포 비율로 인해 사이토카인의 분비자체가 HFD군에 비해 낮았고, 따라서 1,25(OH)₂D에 의한 염증 완화 효과도 적게 관찰되었다고 사료된다.

CON군에 비해 HFD군의 SVC에서 높은 발현을 보인 *Tlr2* mRNA 발현수준이 CON군과 HFD군 모두에서 *in vitro* 1,25(OH)₂D 처리에 의해 낮아진 것을 확인할 수 있었다. 따라서 비타민 D는 비만에 의한 염증성 기전을 개시하는 수용체의 발현을 낮추었고 이로 인해 SVC에서 분비된 염증성 사이토카인 농도가 감소하였을 가능성이 있다. 또한 SVC의 *Dusp1* mRNA 발현수준이 *in vitro* 1,25(OH)₂D 처리에 의해 높아졌는데, MAPK phosphatase1(MKP1)으로도 알려져 있는 *Dusp1*은 MAPK 유전자를 탈인산화하여 불활성화시킴으로써, 염증성 사이토카인 분비를 억제하는 역할을 하는 효소이다(Owens *et al.* 2007). 대식세포 세포를 이용한 선행연구에서는 1,25(OH)₂D가 MKP1(*Dusp1*)의 발현을 증가시킬 뿐 아니라, MKP1가 KO된 마우스의 골수유래 대식세포에서는 비타민 D에 의한 염증 완화효과가 나타나지 않는다고 보고되었다(Zhang *et al.* 2012). 이는 비타민 D가 MKP1(*Dusp1*)을 통해 MAPK 신호전달기전을 억제하여 염증성 사이토카인 분비를 낮추는 것을 의미하며, 본 연구는 마우스의 SVC에서도 비타민 D의 유사한 효과가 있음을 확인하였다. 하지만 비타민 D의 *Tlr2* 발현 감소 및 MAPK 기전 억제를 통한 사이토카인 생성 감소가 PAMP에 대한 보상 반응이 손상된 것으로 해석될 가능성이 있기 때문에(Sadeghi *et al.* 2006), 좀더 다양한 조건에서의 실험을 통해 면역세포에서의 1,25(OH)₂D의 역할을 규명할 필요가 있다.

SVC와 달리 지방세포는 *in vitro* 1,25(OH)₂D 처리에 의한 염증성 사이토카인이 감소되지 않았으며, MCP-1만 비만마우스의 지방세포에서 1,25(OH)₂D 처리에 의해 감소하는 경향성을 보였다. 3T3-L1 혹은 사람의 지방세포에 1,25(OH)₂D를 처리하여 염증성 사이토카인의 분비를 확인한 여러 연구들이 존재하지만, 이들은 서로 상반된 연구결과를 보인다. Sun

등(2008)의 연구에 의하면 성숙한 3T3-L1 세포에 1,25(OH)₂D를 처리한 결과 MCP-1 및 IL-6의 발현이 유의적으로 증가하였다. 반면 Lira 등(2011)과 Marcotorchino 등(2012)은 성숙한 3T3-L1 세포에, Ding 등(2013)은 사람의 지방세포에 1,25(OH)₂D를 처리한 결과 IL-6, IL-1 β , MCP-1의 mRNA 혹은 단백질 수준이 감소되었다고 보고하였으며 상반된 연구 결과의 원인을 규명하지 못하였다. 본 연구는 선행연구들과 달리 pre-adipocyte를 *in vitro*로 분화시켜 실험한 것이 아니라, 지방조직으로부터 이미 성숙한 상태의 지방세포를 분리하여 1,25(OH)₂D를 처리하였으므로 선행 연구와는 다른 결과가 도출된 것으로 사료된다. 본 연구에서 지방조직에서 성숙한 지방세포를 분리할 때, DMEM 배지로 세포를 3번 씻어주긴 하였으나, 추가적인 digestion 과정은 거치지 않았으므로 이와 같은 방법의 차이가 결과에 영향을 미쳤을 가능성도 존재한다. 상반된 연구결과들이 존재하므로, 지방세포에 1,25(OH)₂D가 미치는 영향에 대해서는 세포의 성숙도, 세포의 배양환경 및 분리방법 등을 더 세분화하여 추가적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

본 연구의 결과에 의하면, 비타민 D 섭취가 비만이 야기한 지방조직으로의 대식세포의 침윤을 완화시키지 못하였다. 고지방식이를 섭취한 마우스의 지방조직 내 면역세포 (대식세포, T 세포, NK 세포)의 수가 유의적으로 증가하였으나, 고지방식이 kg당 10,000 IU의 비타민 D를 섭취한 마우스에서 그 비율이 감소되지 않았기 때문이다. Lorente-Cebrian 등(2012)에 의하면, 지방세포에 1,25(OH)₂D를 처리한 결과, MCP-1 뿐 아니라 adiponectin의 분비가 감소된다고 보고하였다. MCP-1이 지방조직의 대식세포 비율을 증가시키는 요인인 반면, adiponectin은 대식세포의 이동을 저해하여 염증 반응을 완화시키는 요인이다. 따라서 MCP-1와 adiponectin 모두를 감소시키는 이러한 비타민 D의 역할로 인해 지방조직에 침윤되는 대식세포의 수가 유의적으로 변화하지 않았을 가능성이 있다. 하지만 고지방식이에 마우스 kg당 3,000 IU의 비타민 D를 추가 제공한 선행연구에서는 비타민 D 섭취에 의한 대식세포의

비율이 감소하고, M1 대식세포의 발현이 감소되었다고 보고하였다(Karcken *et al.* 2015). 이는 본 연구에서 식이에 제공한 비타민 D의 3.3배 이상의 수준을 제공한 것으로써, 만약 비타민 D의 섭취수준을 더 늘릴 경우, 지방조직 내 대식세포의 수가 유의적으로 감소하였을 가능성이 존재한다.

결과적으로 본 연구의 결과를 통해 비타민 D 섭취가 지방조직 내 면역세포의 비율을 변화시키지 않더라도, 1,25(OH)₂D가 지방조직 내 SVC에 작용하여, *Tlr2*의 발현을 감소시키고 *Dusp1*의 발현을 증가시켜, 결과적으로 염증성 사이토카인 분비를 완화시키는 것을 확인하였다. 리뷰 논문에 의하면 사람의 지방조직에서 분비되는 MCP-1, IL-6, IL-1 β , TNF α 이 주로 지방조직의 non-fat cell에서 분비되며, non-fat cell에서 분비되는 양이 fat cell에 비해 8~20배 많다고 보고되었다(Fain 2010). 이는 비만으로 인한 지방조직의 염증반응에 SVC가 큰 역할을 하는 것을 의미한다. 따라서 1,25(OH)₂D에 의한 SVC에서의 염증 완화 기전은 지방조직 전체에서 분비되는 사이토카인 완화에 큰 영향을 미칠 것으로 사료된다.

VI. 결론 및 제언

6.1. 연구요약 및 결론

본 연구에서는 고지방식이로 비만을 유도한 마우스를 이용하여 비타민 D₃ 섭취 정도에 따라 비만이 비타민 D의 흡수와 저장 그리고 혈액의 비타민 D 대사체에 미치는 영향을 확인하고, 비만으로 인한 지방조직의 염증반응에 비타민 D가 미치는 영향을 확인하였다.

비타민 D₃ 섭취 정도에 따라 비만이 혈중 25(OH)D와 그 기전에 미치는 영향을 확인하기 위해 소장에서 비타민 D가 흡수되고 이후 조직에 저장되는 과정을 연구하였다. 조직에서 비타민 D₃를 추출하는 방법의 유효성을 검증 한 뒤, 비만 마우스와 대조 마우스의 지방조직과 간 조직에서 비타민 D₃와 25(OH)D₃를 추출하여 비교하였다. 또한 비타민 D 흡수와 관련된 유전자의 발현을 소장 상부에서 측정하여 비교하였다. 더불어 비타민 D 보충이 비만에서 나타난 혈액과 지방조직의 1,25(OH)₂D 대사에 미치는 영향을 확인하기 위해 PTH 농도와 신장의 비타민 D hydroxylase 유전자 발현을 측정하였으며, 지방조직에서 염증과 관계된 유전자 발현을 확인하였다. 마지막으로 비타민 D가 지방조직의 어떤 세포에서 염증을 완화시키는지 연구하기 위해 비만 마우스와 대조마우스의 지방조직을 지방세포와 SVC로 나누어 *in vitro* 1,25(OH)₂D₃처리의 효과를 확인하였다.

연구 1: 혈액의 25(OH)D 농도는 CVd군과 비교하였을 때 HVd군에서 높았고, LVd군에서 낮았다. 비타민 D₃ 보충 시엔 CON군에 비해 HFD군에서 혈중 25(OH)D가 높았으며, 비타민 D₃ 표준 섭취 시엔 고지방식이 섭취에 의한 차이가 없었고, 비타민 D₃ 부족 섭취 시엔 HFD군의 혈중 25(OH)D가 낮은 경향을 보임으로써, 비타민 D 섭취 정도에 따라 고지방식이가 혈중 25(OH)D에 차별적인 영향을 미쳤다. 먼저 HVd군의 간과 부고환 지방조직에 저장된 비타민 D₃ 농도가

CVd군의 농도에 비해 높았는데 간과 지방조직에서 모두 고지방식이 섭취에 의한 유의적인 비타민 D₃ 농도차이는 보이지 않았다. 하지만 HFD_HVd군의 경우 간과 지방조직에 저장된 비타민 D₃ 함량이 CON_CVd군에 비해 많았다. 이와 같은 조직의 비타민 D₃ 함량 증가는 HFD_HVd군의 혈중 25(OH)D 농도가 CON_HVd군의 값에 비해 상대적으로 낮은 것에 기여한 것으로 보인다. 전반적으로 HFD군에서 소장에서 카일로마이크론의 형성과 관계된 유전자인 *Mttp*의 mRNA 발현이 높았으며, 비타민 D의 흡수와 관계된 *Abcal*의 발현수준이 높았고, *Cd36*의 mRNA 발현은 높은 경향성을 보였는데, 이것은 소장에서의 비타민 D 흡수 증진에 기여하였을 것으로 사료된다. 비타민 D₃를 부족하게 섭취한 경우, CON군과 HFD군 모두 간과 지방조직에 저장된 비타민 D₃의 농도가 정량한계 미만으로 측정할 수 없었는데, 이는 비타민 D 부족 섭취 시 조직에 저장되는 비타민 D₃의 양이 1 ng/g 미만임을 의미한다. 혈액의 25(OH)D 농도가 CON_LVd군에 비해 HFD_LVd군에서 상대적으로 높았던 이유는 조직에 저장되는 비타민 D₃가 거의 없고, 고지방식으로 유도된 비만이 소장에서의 비타민 D 흡수를 증진시켰기 때문으로 사료된다.

연구 2: 혈액의 1,25(OH)₂D 농도는 비타민 D₃ 보충 섭취에 의해 전반적으로 높아졌다. 비타민 D₃를 표준 섭취한 CVd군의 경우 HFD군의 혈청 1,25(OH)₂D 농도 및 PTH의 농도가 CON군에 비해 높았다. 하지만 비타민 D₃를 보충 섭취한 HVd군의 경우 비만에 의한 혈중 1,25(OH)₂D 상승 및 PTH 상승이 관찰되지 않았다. 신장의 *Cyp27a1* mRNA 발현은 비타민 D₃ 보충이나 고지방식이에 의한 유의적인 변화가 관찰되지 않았으며, 신장의 *Cyp24a1*과 *Lrp1(megalin)* mRNA 수준은 전반적으로 비타민 D₃ 보충에 의해 높았다. 하지만 신장의 *Cyp24a1* 발현에는 비타민 D₃ 보충과 고지방식이 섭취 여부에 의한 교호작용이 존재하였고, CON군에서만 비타민 D₃ 보충에 의해 유의적으로 *Cyp24a1* 수준이 높아졌으며 HFD_CVd군과 HFD_HVd군 사이에는 수준의 차이가 없었다.

따라서 비만 마우스의 경우 1,25(OH)₂D의 자가 조절 기전이 CON군에 비해 다소 원활하지 않은 것으로 사료된다. 또한 HFD군의 부고환지방 *Mcp-1*, *Rantes*, *Mip-1* γ 및 *Tnf* α mRNA 수준이 CON군에 비해 높아졌는데, HFD_CVd군에 비해 비타민 D를 보충한 HFD_HVd군에서 *Mcp-1*과 *Rantes* 낮은 mRNA 수준이 관측되었다. 뿐만 아니라, 비타민 D₃를 보충함으로써 *Il-6*와 *Il-1* β 발현이 유의적으로 낮아졌다. 지방조직에서 추출한 25(OH)D가 비타민 D₃ 보충에 의해 그 농도가 증가하였으며, 지방조직에서 *Cyp27b1* mRNA 발현이 확인되었다. 이는 비타민 D₃ 보충에 의해 지방조직에서의 국소적인 1,25(OH)₂D의 생성이 증가할 가능성을 제시하며, 이렇게 생성된 1,25(OH)₂D가 지방조직의 염증반응 완화에 기여한 것으로 사료된다.

연구 3: 고지방식이와 식이 중 비타민 D₃ 보충 여부를 달리 하여 급여한 뒤 지방조직에서 SVC를 분리하고 면역세포의 분포를 확인하였다. 그 결과 고지방식이 섭취로 인해 면역세포 중 대식세포, NK 세포, T 세포의 수가 증가하였으나, 비타민 D₃ 섭취로 인한 유의적인 변화는 없었다. 그 다음으로는 비만마우스(HFD)와 대조마우스(CON)의 부고환 지방조직을 지방세포와 SVC로 분리한 뒤 10 nM의 1,25(OH)₂D₃를 처리하고 LPS로 자극하였다. 그 결과 HFD군의 SVC와 지방세포에서 분비되는 MCP-1과 IL-6의 단백질 농도가 CON군의 수준에 비해 유의적으로 높았다. HFD군의 SVC에 1,25(OH)₂D₃를 처리한 경우 처리하지 않은 경우에 비해 MCP-1, IL-6, IL-1 β 가 감소된 것을 확인할 수 있었으며, CON군의 SVC는 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의해 IL-6의 분비가 감소했다. 더불어 HFD군과 CON군의 SVC의 *Tlr2* mRNA 수준이 1,25(OH)₂D₃처리에 의해 감소하였으며, SVC의 *Dusp1*의 mRNA 수준이 1,25(OH)₂D₃처리에 의해 CON군에서는 유의적으로 증가하였으며, HFD군에서는 증가 경향성을 보였다. SVC와는 달리 지방세포에 1,25(OH)₂D₃를 처리한 결과, HFD군에서는 MCP-1이 감소 경향성을 보였으나 다른 사이토카인의 분비는 차이가 없었으며, CON군의

지방세포는 1,25(OH)₂D₃ 처리에 의한 차이를 보이지 않았다. 따라서 비타민 D는 지방조직 내 SVC의 염증기전을 저해하여 지방조직의 염증성 사이토카인의 분비를 감소시키는 것으로 보여지며, 지방조직 내 면역세포의 비율에 비타민 D가 미치는 영향에 대해서는 더 연구가 필요하다고 생각된다.

체내에 지방조직이 과다하게 축적된 상태로 정의되는 비만은 증가된 지방조직의 부피와 지방조직에서 분비되는 여러 단백질들의 생성 변화, 그리고 이로 인한 체내의 다른 조직의 유전자 발현 조절을 통하여 비타민 D의 대사에 영향을 미친다. 뿐만 아니라, 비타민 D 섭취 여부도 비만이 야기하는 지방조직의 대사 변화에 기여한다. 가장 잘 알려진 비만에서의 비타민 D 대사 이상은 혈중 25(OH)D의 저하이다. 명확하게 기전이 규명되지 않았으나, 비만으로 인해 증가한 지방조직에 축적된 비타민 D가 비타민 D 대사 이상의 유력한 원인으로 꼽힌다. 하지만 조직 내 비타민 D 농도를 측정한 연구가 적으므로 조직의 비타민 D를 측정함으로써 비만의 비타민 D 대사를 좀 더 명확하게 규명하는 것을 목표로 하였다. 연구 결과 비타민 D를 보충 섭취하였을 때만 비만마우스에서 혈액의 25(OH)D가 상대적으로 낮았으며, 표준 섭취한 경우에는 혈액의 25(OH)D 차이가 없었다. 기존의 임상 연구와 다소 다른 결과가 나타나긴 하였지만 동물 실험의 경우 피부를 통해 합성되는 비타민 D를 통제할 수 있고, 섭취하는 비타민 D의 양을 정확하게 제공하기 때문에 비만이 섭취하는 비타민 D 대사에 미치는 정확한 효과를 확인할 수 있었다고 생각된다. 지방조직과 간에서 비타민 D₃를 측정한 결과 비타민 D 보충 섭취에 의해서 저장되는 비타민 D₃의 양이 비타민 D 표준 섭취 시에 비해 70 배 이상 높았으나, 비만 마우스와 대조 마우스 사이에는 유의적인 농도 차이가 없었다. 이는 Drincic 등(2012) 이 주장한 “부피 증가에 따른 총 비타민 D 농도 희석설”과 일치하는 결과이다. 비만이 조직의 비타민 D 농도에는 영향을 주지 않았으나, 비만마우스의 조직 부피 증가가 조직에 저장된 총 비타민 D의

양을 증가시켜 혈중 25(OH)D가 낮아진 것으로 보인다. 하지만 이러한 비만 마우스의 조직 증가에 따른 혈액 25(OH)D의 저하는 비타민 D를 표준으로 섭취하거나 부족하게 섭취한 경우에는 관찰되지 않았다. 이는 비타민 D의 섭취가 많은 경우엔 주로 비타민 D가 조직에 저장되지만 비타민 D 섭취가 부족할 경우엔 비타민 D가 대부분 혈액에서 25(OH)D로 hydroxylation된다고 보고한 Heaney 등(2009)의 결과와 일치하는 결과이다. 우리의 연구에서도 비타민 D를 부족하게 먹인 경우엔 조직에 저장되는 비타민 D3의 양이 1 ng 미만이었으므로 조직에 저장되기 보다는 혈액의 25(OH)D로 전환되었음이 확인되었다. 또한 비만마우스의 혈중 25(OH)D 농도가 대조마우스에 비해 오히려 높은 경향성을 보였으므로, 이는 비만 마우스의 증진된 비타민 D 흡수가 반영되었을 가능성이 있다.

비만인 경우에 관찰된 또 다른 비타민 D 대사 이상은 혈중 1,25(OH)₂D의 상승이다. 선행연구와 마찬가지로 대조 수준으로 비타민 D를 섭취하였을 때는 비만일 경우 혈액의 1,25(OH)₂D가 높았으나, 비타민 D를 보충 섭취하였을 때는 비만으로 인한 1,25(OH)₂D의 상승이 관찰되지 않았다. 일차적으로는 충분한 비타민 D 섭취와 이로 인해 높아진 혈액의 1,25(OH)₂D수치가 칼슘의 항상성 유지를 위해 조절되어야 하므로 PTH 상승기전을 억제한 것으로 사료된다. 따라서 비만에 의한 PTH 상승이 없었으므로 1,25(OH)₂D도 상승하지 않은 것으로 보인다. 비타민 D를 보충 섭취할 경우 혈액의 1,25(OH)₂D이 상승되었으므로 신장의 *Cyp24a1* 발현이 증가되어야 하는데, 비만마우스에서는 이것이 유의적으로 증가되지 않았다. 따라서 비만마우스의 1,25(OH)₂D의 자가 조절 기전은 대조마우스에 비해 원활하지 않았던 것으로 사료된다.

비만마우스의 지방조직에서는 만성적인 정도의 염증이 야기되는데 비타민 D 섭취를 통해 염증성 케모카인 및 사이토카인의 수준이 완화되는 것을 확인하였다. 지방조직에서 25(OH)D를 추출하였으며, *Cyp27b1* 및 *Vdr*의 발현을 확인하였으므로 지방조직에서 1,25(OH)₂D가

국소적으로 생성되었을 것으로 사료되며, 이것이 지방조직의 염증 반응 완화에 기여하였을 것으로 사료된다. 비타민 D의 섭취가 염증반응을 완화하였으나, 지방조직의 침윤되는 면역세포의 수를 감소시키지는 않았다. 다만 1,25(OH)₂D의 처리는 SVC의 *Tlr2* 수준을 감소시키고, MAPK 기전을 억제하여 SVC에서 분비되는 염증성 사이토카인의 분비를 낮추었다. 따라서 비타민 D는 지방조직에 침윤되는 세포의 수를 조절하기 보다는 지방조직 내 면역세포의 염증과 관계된 유전자 발현을 억제하는 것으로 보인다.

6.2. 제언

비타민 D 보충섭취는 혈액의 25(OH)D, 1,25(OH)₂D 농도를 상승시킬 뿐 아니라 조직 내 비타민 D와 25(OH)D 농도를 높인다. 조직 내 비타민 D 수준의 상승은 체내에 저장된, 즉 생체에서 이용되지 않는 비타민 D의 비율이 상승된 것을 의미한다. 비타민 D 보충 섭취 시 비만마우스의 간과 지방조직 내 비타민 D 함량이 대조마우스에 비해 높았고 혈액의 25(OH)D 농도는 낮았는데, 이는 비만한 경우 비타민 D를 보충했을 때의 체내 생체이용률이 저하되는 것을 의미한다. 따라서 비타민 D를 보충할 때, 비만한 사람이 비만하지 않은 사람과 동일한 효과를 기대할 경우 섭취량을 증가시켜야 할 가능성이 존재하며 이와 관련된 임상연구가 필요할 것으로 보인다.

또한 본 연구를 통해 비만이 야기한 정도의 만성적인 염증반응이 비타민 D 보충섭취를 통해 완화되는 것을 확인할 수 있었다. 비만으로 인한 염증반응이 심화되면 대사 증후군을 야기할 가능성이 높으므로, 비타민 D를 보충하면 이를 완화시킬 가능성이 있을 것으로 보인다. 하지만 비만으로 인한 염증반응 이외의 다른 질환에 비타민 D가 미치는 영향이 있을 수 있으므로 이를 함께 고려하여 비타민 D 보충 정도에 대한 추가적인 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 사료된다..

참 고 문 헌

Abbas, M. A. (2017). "Physiological functions of Vitamin D in adipose tissue." J Steroid Biochem Mol Biol **165**(Pt B): 369-381.

Abumrad, N. A. and N. O. Davidson (2012). "Role of the gut in lipid homeostasis." Physiol Rev **92**(3): 1061-1085.

Afzal, S., P. Brondum-Jacobsen, S. E. Bojesen and B. G. Nordestgaard (2014). "Vitamin D concentration, obesity, and risk of diabetes: a mendelian randomisation study." Lancet Diabetes Endocrinol **2**(4): 298-306.

Ahmad, R., A. Al-Mass, V. Atizado, A. Al-Hubail, F. Al-Ghimlas, M. Al-Arouj, A. Bennakhi, S. Dermime and K. Behbehani (2012). "Elevated expression of the toll like receptors 2 and 4 in obese individuals: its significance for obesity-induced inflammation." J Inflamm (Lond) **9**(1): 48.

Alshahrani, F. and N. Aljohani (2013). "Vitamin D: deficiency, sufficiency and toxicity." Nutrients **5**(9): 3605-3616.

Barger-Lux, M. J., R. P. Heaney, S. Dowell, T. C. Chen and M. F. Holick (1998). "Vitamin D and its major metabolites: serum levels after graded oral dosing in healthy men." Osteoporos Int **8**(3): 222-230.

Bell, N. H., S. Epstein, A. Greene, J. Shary, M. J. Oexmann and S. Shaw (1985). "Evidence for alteration of the vitamin D-endocrine system in obese subjects." J Clin Invest **76**(1): 370-373.

Bell, N. H., S. Shaw and R. T. Turner (1984). "Evidence that 1,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits the hepatic production of 25-hydroxyvitamin D in man." J Clin Invest **74**(4): 1540-1544.

Blomstrand, R. and L. Forsgren (1967). "Intestinal absorption and esterification of vitamin D₃-1,2-³H in man." Acta Chem Scand **21**(6): 1662-1663.

Blum, M., G. Dolnikowski, E. Seyoum, S. S. Harris, S. L. Booth, J. Peterson, E. Saltzman and B. Dawson-Hughes (2008). "Vitamin D(3) in fat tissue." Endocrine **33**(1): 90-94.

Burild, A., C. Lauridsen, N. Faqir, H. M. Sommer and J. Jakobsen (2016). "Vitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 in pork and their relationship to vitamin D status in pigs." J Nutr Sci **5**: e3.

Camozzi, V., A. C. Frigo, M. Zaninotto, F. Sanguin, M. Plebani, M. Boscaro, L. Schiavon and G. Luisetto (2016). "25-Hydroxycholecalciferol response to single oral cholecalciferol loading in the normal weight, overweight, and obese." Osteoporos Int **27**(8): 2593-2602.

Carrelli, A., M. Bucovsky, R. Horst, S. Cremers, C. Zhang, M. Bessler, B. Schrope, J. Evanko, J. Blanco, S. J. Silverberg and E. M. Stein (2017). "Vitamin D Storage in Adipose Tissue of Obese and Normal Weight Women." J Bone Miner Res **32**(2): 237-242.

Chen, G. Y. and G. Nunez (2010). "Sterile inflammation: sensing and reacting to damage." Nat Rev Immunol **10**(12): 826-837.

Cheng, S., J. M. Massaro, C. S. Fox, M. G. Larson, M. J. Keyes, E. L. McCabe, S. J. Robins, C. J. O'Donnell, U. Hoffmann, P. F. Jacques, S. L. Booth, R. S. Vasan, M. Wolf and T. J. Wang (2010). "Adiposity, cardiometabolic risk, and vitamin D status: the Framingham Heart Study." Diabetes **59**(1): 242-248.

Chirumbolo, S. (2015). "The role of vitamin D towards immune tolerance in white adipose tissue (WAT)." Endocr Metab Immune Disord Drug Targets **15**(4): 277-287.

Choe, S. S., J. Y. Huh, I. J. Hwang, J. I. Kim and J. B. Kim (2016). "Adipose Tissue Remodeling: Its Role in Energy Metabolism and Metabolic Disorders." Front Endocrinol (Lausanne) **7**: 30.

Chow, E. C., H. P. Quach, R. Vieth and K. S. Pang (2013). "Temporal changes in tissue 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3, vitamin D receptor target genes,

and calcium and PTH levels after 1,25(OH)₂D₃ treatment in mice." Am J Physiol Endocrinol Metab **304**(9): E977-989.

Chun, R. F., J. S. Adams and M. Hewison (2008). "Back to the future: a new look at 'old' vitamin D." J Endocrinol **198**(2): 261-269.

Cinti, S., G. Mitchell, G. Barbatelli, I. Murano, E. Ceresi, E. Faloia, S. Wang, M. Fortier, A. S. Greenberg and M. S. Obin (2005). "Adipocyte death defines macrophage localization and function in adipose tissue of obese mice and humans." J Lipid Res **46**(11): 2347-2355.

Cohen-Lahav, M., S. Shany, D. Tobvin, C. Chaimovitz and A. Douvdevani (2006). "Vitamin D decreases NFkappaB activity by increasing IkappaBalpha levels." Nephrol Dial Transplant **21**(4): 889-897.

Compston, J. E., A. L. Merrett, F. G. Hammett and P. Magill (1981). "Comparison of the appearance of radiolabelled vitamin D₃ and 25-hydroxy-vitamin D₃ in the chylomicron fraction of plasma after oral administration in man." Clin Sci (Lond) **60**(2): 241-243.

Compston, J. E., S. Vedi, J. E. Ledger, A. Webb, J. C. Gazet and T. R. Pilkington (1981). "Vitamin D status and bone histomorphometry in gross obesity." Am J Clin Nutr **34**(11): 2359-2363.

Creely, S. J., P. G. McTernan, C. M. Kusminski, M. Fisher f, N. F. Da Silva, M. Khanolkar, M. Evans, A. L. Harte and S. Kumar (2007). "Lipopolysaccharide activates an innate immune system response in human adipose tissue in obesity and type 2 diabetes." Am J Physiol Endocrinol Metab **292**(3): E740-747.

Davis, H. R., Jr., L. J. Zhu, L. M. Hoos, G. Tetzloff, M. Maguire, J. Liu, X. Yao, S. P. Iyer, M. H. Lam, E. G. Lund, P. A. Detmers, M. P. Graziano and S. W. Altmann (2004). "Niemann-Pick C1 Like 1 (NPC1L1) is the intestinal phytosterol and cholesterol transporter and a key modulator of whole-body cholesterol homeostasis." J Biol Chem **279**(32): 33586-33592.

Dawson-Hughes, B., S. S. Harris, N. J. Palermo, L. Ceglia and H.

Rasmussen (2013). "Meal conditions affect the absorption of supplemental vitamin D3 but not the plasma 25-hydroxyvitamin D response to supplementation." J Bone Miner Res **28**(8): 1778-1783.

DeFuria, J., A. C. Belkina, M. Jagannathan-Bogdan, J. Snyder-Cappione, J. D. Carr, Y. R. Nersesova, D. Markham, K. J. Strissel, A. A. Watkins, M. Zhu, J. Allen, J. Bouchard, G. Toraldo, R. Jasuja, M. S. Obin, M. E. McDonnell, C. Apovian, G. V. Denis and B. S. Nikolajczyk (2013). "B cells promote inflammation in obesity and type 2 diabetes through regulation of T-cell function and an inflammatory cytokine profile." Proc Natl Acad Sci U S A **110**(13): 5133-5138.

Del Valle, H. B., A. L. Yaktine, C. L. Taylor and A. C. Ross (2011). Dietary reference intakes for calcium and vitamin D, National Academies Press.

DeLuca, H. F. (2004). "Overview of general physiologic features and functions of vitamin D." Am J Clin Nutr **80**(6 Suppl): 1689S-1696S.

DeLuca, H. F. and M. T. Cantorna (2001). "Vitamin D: its role and uses in immunology." Faseb j **15**(14): 2579-2585.

Didriksen, A., A. Burild, J. Jakobsen, O. M. Fuskevåg and R. Jorde (2015). "Vitamin D3 increases in abdominal subcutaneous fat tissue after supplementation with vitamin D3." Eur J Endocrinol **172**(3): 235-241.

Ding, C., J. P. Wilding and C. Bing (2013). "1,25-dihydroxyvitamin D3 protects against macrophage-induced activation of NFκB and MAPK signalling and chemokine release in human adipocytes." PLoS One **8**(4): e61707.

Drincic, A. T., L. A. Armas, E. E. Van Diest and R. P. Heaney (2012). "Volumetric dilution, rather than sequestration best explains the low vitamin D status of obesity." Obesity (Silver Spring) **20**(7): 1444-1448.

Elgazar-Carmon, V., A. Rudich, N. Hadad and R. Levy (2008). "Neutrophils transiently infiltrate intra-abdominal fat early in the course of high-fat feeding." J Lipid Res **49**(9): 1894-1903.

Fabbrini, E., M. Cella, S. A. McCartney, A. Fuchs, N. A. Abumrad, T. A. Pietka, Z. Chen, B. N. Finck, D. H. Han, F. Magkos, C. Conte, D. Bradley, G. Fraterrigo, J. C. Eagon, B. W. Patterson, M. Colonna and S. Klein (2013). "Association between specific adipose tissue CD4⁺ T-cell populations and insulin resistance in obese individuals." Gastroenterology **145**(2): 366-374.e361-363.

Fain, J. N. (2010). "Release of inflammatory mediators by human adipose tissue is enhanced in obesity and primarily by the nonfat cells: a review." Mediators Inflamm **2010**: 513948.

Fantuzzi, G. (2005). "Adipose tissue, adipokines, and inflammation." J Allergy Clin Immunol **115**(5): 911-919; quiz 920.

Fleet, J. C. (2004). "Rapid, membrane-initiated actions of 1,25 dihydroxyvitamin D: what are they and what do they mean?" J Nutr **134**(12): 3215-3218.

Fleet, J. C., C. Gliniak, Z. Zhang, Y. Xue, K. B. Smith, R. McCreedy and S. A. Adedokun (2008). "Serum metabolite profiles and target tissue gene expression define the effect of cholecalciferol intake on calcium metabolism in rats and mice." J Nutr **138**(6): 1114-1120.

Folch, J., M. Lees and G. H. Sloane Stanley (1957). "A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues." J Biol Chem **226**(1): 497-509.

Friedman, J. M., R. L. Leibel, D. S. Siegel, J. Walsh and N. Bahary (1991). "Molecular mapping of the mouse ob mutation." Genomics **11**(4): 1054-1062.

Gao, D., P. Trayhurn and C. Bing (2013). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the cytokine-induced secretion of MCP-1 and reduces monocyte recruitment by human preadipocytes." Int J Obes (Lond) **37**(3): 357-365.

Garcia, O. P., K. Z. Long and J. L. Rosado (2009). "Impact of micronutrient deficiencies on obesity." Nutr Rev **67**(10): 559-572.

Grethen, E., R. McClintock, C. E. Gupta, R. Jones, B. M. Cacucci, D. Diaz, A. D. Fulford, S. M. Perkins, R. V. Considine and M. Peacock (2011). "Vitamin D and hyperparathyroidism in obesity." J Clin Endocrinol Metab **96**(5): 1320-1326.

Gropper, S. S. and J. L. Smith (2012). Advanced nutrition and human metabolism, Cengage Learning.

Haddad, J. G., L. Y. Matsuoka, B. W. Hollis, Y. Z. Hu and J. Wortsman (1993). "Human plasma transport of vitamin D after its endogenous synthesis." J Clin Invest **91**(6): 2552-2555.

Hauser, H., J. H. Dyer, A. Nandy, M. A. Vega, M. Werder, E. Bieliauskaite, F. E. Weber, S. Compassi, A. Gemperli, D. Boffelli, E. Wehrli, G. Schulthess and M. C. Phillips (1998). "Identification of a receptor mediating absorption of dietary cholesterol in the intestine." Biochemistry **37**(51): 17843-17850.

Heaney, R. P., L. A. Armas, J. R. Shary, N. H. Bell, N. Binkley and B. W. Hollis (2008). "25-Hydroxylation of vitamin D3: relation to circulating vitamin D3 under various input conditions." Am J Clin Nutr **87**(6): 1738-1742.

Heaney, R. P., R. L. Horst, D. M. Cullen and L. A. Armas (2009). "Vitamin D3 distribution and status in the body." J Am Coll Nutr **28**(3): 252-256.

Hewison, M., F. Burke, K. N. Evans, D. A. Lammas, D. M. Sansom, P. Liu, R. L. Modlin and J. S. Adams (2007). "Extra-renal 25-hydroxyvitamin D3-1alpha-hydroxylase in human health and disease." J Steroid Biochem Mol Biol **103**(3-5): 316-321.

Himes, R. W. and C. W. Smith (2010). "Tlr2 is critical for diet-induced metabolic syndrome in a murine model." Faseb j **24**(3): 731-739.

Hirsch, J. and P. W. Han (1969). "Cellularity of rat adipose tissue: effects of growth, starvation, and obesity." J Lipid Res **10**(1): 77-82.

Hirsch, J. and J. L. Knittle (1970). "Cellularity of obese and nonobese human adipose tissue." Fed Proc **29**(4): 1516-1521.

Holick, M. and M. Favus (2003). Vitamin D: photobiology, metabolism, mechanism of action, and clinical applications.

Holick, M. F. (2009). "Vitamin D status: measurement, interpretation, and clinical application." Ann Epidemiol **19**(2): 73-78.

Hollander, D., K. S. Muralidhara and A. Zimmerman (1978). "Vitamin D-3 intestinal absorption in vivo: influence of fatty acids, bile salts, and perfusate pH on absorption." Gut **19**(4): 267-272.

Holman, C. A., E. B. Mawer and D. J. Smith (1970). "Tissue distribution of cholecalciferol (vitamin D(3)) in the rat." Biochem J **120**(4): 29p-30p.

Hussain, M. M., N. Nijstad and L. Franceschini (2011). "Regulation of microsomal triglyceride transfer protein." Clin Lipidol **6**(3): 293-303.

Jakobsen, J., H. Maribo, A. Bysted, H. M. Sommer and O. Hels (2007). "25-hydroxyvitamin D3 affects vitamin D status similar to vitamin D3 in pigs--but the meat produced has a lower content of vitamin D." Br J Nutr **98**(5): 908-913.

Jernas, M., J. Palming, K. Sjöholm, E. Jennische, P. A. Svensson, B. G. Gabrielsson, M. Levin, A. Sjögren, M. Rudemo, T. C. Lystig, B. Carlsson, L. M. Carlsson and M. Lonn (2006). "Separation of human adipocytes by size: hypertrophic fat cells display distinct gene expression." Faseb j **20**(9): 1540-1542.

Jones, G., D. E. Prosser and M. Kaufmann (2012). "25-Hydroxyvitamin D-24-hydroxylase (CYP24A1): its important role in the degradation of vitamin D." Arch Biochem Biophys **523**(1): 9-18.

Jones, G., S. A. Strugnell and H. F. DeLuca (1998). "Current understanding of the molecular actions of vitamin D." Physiol Rev **78**(4): 1193-1231.

Jung, Y. S., D. Wu, D. Smith, S. N. Meydani and S. N. Han (2018). "Dysregulated 1,25-dihydroxyvitamin D levels in high-fat diet-induced obesity can be restored by changing to a lower-fat diet in mice." Nutr Res **53**: 51-60.

Jurutka, P. W., G. K. Whitfield, J. C. Hsieh, P. D. Thompson, C. A. Haussler and M. R. Haussler (2001). "Molecular nature of the vitamin D receptor and its role in regulation of gene expression." Rev Endocr Metab Disord **2**(2): 203-216.

Kalupahana, N. S., N. Moustaid-Moussa and K. J. Claycombe (2012). "Immunity as a link between obesity and insulin resistance." Mol Aspects Med **33**(1): 26-34.

Karkeni, E., J. Marcotorchino, F. Tourniaire, J. Astier, F. Peiretti, P. Darmon and J. F. Landrier (2015). "Vitamin D limits chemokine expression in adipocytes and macrophage migration in vitro and in male mice." Endocrinology **156**(5): 1782-1793.

Kim, S. H., M. K. Oh, R. Namgung and M. J. Park (2014). "Prevalence of 25-hydroxyvitamin D deficiency in Korean adolescents: association with age, season and parental vitamin D status." Public Health Nutr **17**(1): 122-130.

Kong, J., Y. Chen, G. Zhu, Q. Zhao and Y. C. Li (2013). "1,25-Dihydroxyvitamin D₃ upregulates leptin expression in mouse adipose tissue." J Endocrinol **216**(2): 265-271.

Konradsen, S., H. Ag, F. Lindberg, S. Hexeberg and R. Jorde (2008). "Serum 1,25-dihydroxy vitamin D is inversely associated with body mass index." Eur J Nutr **47**(2): 87-91.

Krieger, M. (1999). "Charting the fate of the "good cholesterol": identification and characterization of the high-density lipoprotein receptor SR-BI." Annu Rev Biochem **68**: 523-558.

Lee, J. Y., K. H. Sohn, S. H. Rhee and D. Hwang (2001). "Saturated fatty acids, but not unsaturated fatty acids, induce the expression of cyclooxygenase-2 mediated through Toll-like receptor 4." J Biol Chem **276**(20): 16683-16689.

Lehr, S., S. Hartwig, D. Lamers, S. Famulla, S. Muller, F. G. Hanisch, C. Cuvelier, J. Ruige, K. Eckardt, D. M. Ouwens, H. Sell and J. Eckel (2012). "Identification and validation of novel adipokines released from primary human

adipocytes." Mol Cell Proteomics **11**(1): M111.010504.

Lin, M. C., C. Arbeeny, K. Bergquist, B. Kienzle, D. A. Gordon and J. R. Wetterau (1994). "Cloning and regulation of hamster microsomal triglyceride transfer protein. The regulation is independent from that of other hepatic and intestinal proteins which participate in the transport of fatty acids and triglycerides." J Biol Chem **269**(46): 29138-29145.

Lipkie, T. E., A. Janasch, B. R. Cooper, E. E. Hohman, C. M. Weaver and M. G. Ferruzzi (2013). "Quantification of vitamin D and 25-hydroxyvitamin D in soft tissues by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci **932**: 6-11.

Lira, F. S., J. C. Rosa, C. A. Cunha, E. B. Ribeiro, C. O. do Nascimento, L. M. Oyama and J. F. Mota (2011). "Supplementing alpha-tocopherol (vitamin E) and vitamin D3 in high fat diet decrease IL-6 production in murine epididymal adipose tissue and 3T3-L1 adipocytes following LPS stimulation." Lipids Health Dis **10**: 37.

Liu, P. T., S. Stenger, H. Li, L. Wenzel, B. H. Tan, S. R. Krutzik, M. T. Ochoa, J. Schaubert, K. Wu, C. Meinken, D. L. Kamen, M. Wagner, R. Bals, A. Steinmeyer, U. Zugel, R. L. Gallo, D. Eisenberg, M. Hewison, B. W. Hollis, J. S. Adams, B. R. Bloom and R. L. Modlin (2006). "Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response." Science **311**(5768): 1770-1773.

Liu, S., A. Gupta and L. D. Quarles (2007). "Emerging role of fibroblast growth factor 23 in a bone-kidney axis regulating systemic phosphate homeostasis and extracellular matrix mineralization." Curr Opin Nephrol Hypertens **16**(4): 329-335.

Lobo, M. V., L. Huerta, N. Ruiz-Velasco, E. Teixeira, P. de la Cueva, A. Celdran, A. Martin-Hidalgo, M. A. Vega and R. Bragado (2001). "Localization of the lipid receptors CD36 and CLA-1/SR-BI in the human gastrointestinal tract: towards the identification of receptors mediating the intestinal absorption of dietary

lipids." J Histochem Cytochem **49**(10): 1253-1260.

Lorente-Cebrian, S., A. Eriksson, T. Dunlop, N. Mejhert, I. Dahlman, G. Astrom, E. Sjolín, K. Wahlen, C. Carlberg, J. Laurencikiene, P. Heden, P. Arner and M. Ryden (2012). "Differential effects of 1 α ,25-dihydroxycholecalciferol on MCP-1 and adiponectin production in human white adipocytes." Eur J Nutr **51**(3): 335-342.

Lumeng, C. N. and A. R. Saltiel (2011). "Inflammatory links between obesity and metabolic disease." J Clin Invest **121**(6): 2111-2117.

Lynch, L. (2014). "Adipose invariant natural killer T cells." Immunology **142**(3): 337-346.

Mai, X. M., Y. Chen, C. A. Camargo, Jr. and A. Langhammer (2012). "Cross-sectional and prospective cohort study of serum 25-hydroxyvitamin D level and obesity in adults: the HUNT study." Am J Epidemiol **175**(10): 1029-1036.

Makki, K., P. Froguel and I. Wolowczuk (2013). "Adipose tissue in obesity-related inflammation and insulin resistance: cells, cytokines, and chemokines." ISRN Inflamm **2013**: 139239.

Malmberg, P., T. Karlsson, H. Svensson, M. Lonn, N. G. Carlsson, A. S. Sandberg, E. Jennische, A. Osmancevic and A. Holmang (2014). "A new approach to measuring vitamin D in human adipose tissue using time-of-flight secondary ion mass spectrometry: a pilot study." J Photochem Photobiol B **138**: 295-301.

Marcotorchino, J., E. Gouranton, B. Romier, F. Tourniaire, J. Astier, C. Malezet, M. J. Amiot and J. F. Landrier (2012). "Vitamin D reduces the inflammatory response and restores glucose uptake in adipocytes." Mol Nutr Food Res **56**(12): 1771-1782.

Martinaityte, I., E. Kamycheva, A. Didriksen, J. Jakobsen and R. Jorde (2017). "Vitamin D Stored in Fat Tissue During a 5-Year Intervention Affects Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels the Following Year." J Clin Endocrinol Metab **102**(10): 3731-3738.

Mawer, E. B., J. Backhouse, C. A. Holman, G. A. Lumb and S. W. Stanbury (1972). "The distribution and storage of vitamin D and its metabolites in human tissues." Clin Sci **43**(3): 413-431.

Mezza, T., G. Muscogiuri, G. P. Sorice, A. Priolella, E. Salomone, A. Pontecorvi and A. Giaccari (2012). "Vitamin D deficiency: a new risk factor for type 2 diabetes?" Ann Nutr Metab **61**(4): 337-348.

Minokoshi, Y., Y. B. Kim, O. D. Peroni, L. G. Fryer, C. Muller, D. Carling and B. B. Kahn (2002). "Leptin stimulates fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nature **415**(6869): 339-343.

Mulligan, G. B. and A. Licata (2010). "Taking vitamin D with the largest meal improves absorption and results in higher serum levels of 25-hydroxyvitamin D." J Bone Miner Res **25**(4): 928-930.

Murillo, G., V. Nagpal, N. Tiwari, R. V. Benya and R. G. Mehta (2010). "Actions of vitamin D are mediated by the TLR4 pathway in inflammation-induced colon cancer." J Steroid Biochem Mol Biol **121**(1-2): 403-407.

Mutt, S. J., E. Hypponen, J. Saarnio, M. R. Jarvelin and K. H. Herzig (2014). "Vitamin D and adipose tissue-more than storage." Front Physiol **5**: 228.

Mutt, S. J., T. Karhu, S. Lehtonen, P. Lehenkari, C. Carlberg, J. Saarnio, S. Sebert, E. Hypponen, M. R. Jarvelin and K. H. Herzig (2012). "Inhibition of cytokine secretion from adipocytes by 1,25-dihydroxyvitamin D(3) via the NF-kappaB pathway." Faseb j **26**(11): 4400-4407.

Nishimura, S., I. Manabe, M. Nagasaki, K. Eto, H. Yamashita, M. Ohsugi, M. Otsu, K. Hara, K. Ueki, S. Sugiura, K. Yoshimura, T. Kadowaki and R. Nagai (2009). "CD8+ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity." Nat Med **15**(8): 914-920.

Owens, D. M. and S. M. Keyse (2007). "Differential regulation of MAP kinase signalling by dual-specificity protein phosphatases." Oncogene **26**(22): 3203-3213.

Parikh, S. J., M. Edelman, G. I. Uwaifo, R. J. Freedman, M. Semega-Janneh, J. Reynolds and J. A. Yanovski (2004). "The relationship between obesity and serum 1,25-dihydroxy vitamin D concentrations in healthy adults." J Clin Endocrinol Metab **89**(3): 1196-1199.

Park, J. M., C. Y. Park and S. N. Han (2015). "High fat diet-Induced obesity alters vitamin D metabolizing enzyme expression in mice." Biofactors **41**(3): 175-182.

Penna, G., S. Amuchastegui, N. Giarratana, K. C. Daniel, M. Vulcano, S. Sozzani and L. Adorini (2007). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 selectively modulates tolerogenic properties in myeloid but not plasmacytoid dendritic cells." J Immunol **178**(1): 145-153.

Pereira-Santos, M., P. R. Costa, A. M. Assis, C. A. Santos and D. B. Santos (2015). "Obesity and vitamin D deficiency: a systematic review and meta-analysis." Obes Rev **16**(4): 341-349.

Piccolo, B. D., G. Dolnikowski, E. Seyoum, A. P. Thomas, E. R. Gertz, E. C. Souza, L. R. Woodhouse, J. W. Newman, N. L. Keim, S. H. Adams and M. D. Van Loan (2013). "Association between subcutaneous white adipose tissue and serum 25-hydroxyvitamin D in overweight and obese adults." Nutrients **5**(9): 3352-3366.

Prietl, B., G. Treiber, T. R. Pieber and K. Amrein (2013). "Vitamin D and immune function." Nutrients **5**(7): 2502-2521.

Qi, Q., Y. Zheng, T. Huang, J. Rood, G. A. Bray, F. M. Sacks and L. Qi (2015). "Vitamin D metabolism-related genetic variants, dietary protein intake and improvement of insulin resistance in a 2 year weight-loss trial: POUNDS Lost." Diabetologia **58**(12): 2791-2799.

Quarles, L. D. (2008). "Endocrine functions of bone in mineral metabolism regulation." J Clin Invest **118**(12): 3820-3828.

Raimundo, F. V., G. A. Faulhaber, P. K. Menegatti, S. Marques Lda and T.

W. Furlanetto (2011). "Effect of High- versus Low-Fat Meal on Serum 25-Hydroxyvitamin D Levels after a Single Oral Dose of Vitamin D: A Single-Blind, Parallel, Randomized Trial." Int J Endocrinol **2011**: 809069.

Reboul, E. (2015). "Intestinal absorption of vitamin D: from the meal to the enterocyte." Food Funct **6**(2): 356-362.

Reboul, E. and P. Borel (2011). "Proteins involved in uptake, intracellular transport and basolateral secretion of fat-soluble vitamins and carotenoids by mammalian enterocytes." Prog Lipid Res **50**(4): 388-402.

Reboul, E., A. Goncalves, C. Comera, R. Bott, M. Nowicki, J. F. Landrier, D. Jourdeuil-Rahmani, C. Dufour, X. Collet and P. Borel (2011). "Vitamin D intestinal absorption is not a simple passive diffusion: evidences for involvement of cholesterol transporters." Mol Nutr Food Res **55**(5): 691-702.

Revelli, A., M. Massobrio and J. Tesarik (1998). "Nongenomic effects of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D(3)." Trends Endocrinol Metab **9**(10): 419-427.

Rosenstreich, S. J., C. Rich and W. Volwiler (1971). "Deposition in and release of vitamin D₃ from body fat: evidence for a storage site in the rat." J Clin Invest **50**(3): 679-687.

Roth, C. L., C. T. Elfers, D. P. Figlewicz, S. J. Melhorn, G. J. Morton, A. Hoofnagle, M. M. Yeh, J. E. Nelson and K. V. Kowdley (2012). "Vitamin D deficiency in obese rats exacerbates nonalcoholic fatty liver disease and increases hepatic resistin and Toll-like receptor activation." Hepatology **55**(4): 1103-1111.

Rungby, J., L. Mortensen, K. Jakobsen, A. Brock and L. Mosekilde (1993). "Distribution of hydroxylated vitamin D metabolites [25OHD₃ and 1,25(OH)₂D₃] in domestic pigs: evidence that 1,25(OH)₂D₃ is stored outside the blood circulation?" Comp Biochem Physiol Comp Physiol **104**(3): 483-484.

Sadeghi, K., B. Wessner, U. Laggner, M. Ploder, D. Tamandl, J. Friedl, U. Zugel, A. Steinmeyer, A. Pollak, E. Roth, G. Boltz-Nitulescu and A. Spittler (2006). "Vitamin D₃ down-regulates monocyte TLR expression and triggers

hyporesponsiveness to pathogen-associated molecular patterns." Eur J Immunol **36**(2): 361-370.

Saltiel, A. R. and J. M. Olefsky (2017). "Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease." J Clin Invest **127**(1): 1-4.

Scherer, P. E., S. Williams, M. Fogliano, G. Baldini and H. F. Lodish (1995). "A novel serum protein similar to C1q, produced exclusively in adipocytes." J Biol Chem **270**(45): 26746-26749.

Shi, H., M. V. Kokoeva, K. Inouye, I. Tzameli, H. Yin and J. S. Flier (2006). "TLR4 links innate immunity and fatty acid-induced insulin resistance." J Clin Invest **116**(11): 3015-3025.

Sun, X. and M. B. Zemel (2007). "Calcium and 1,25-dihydroxyvitamin D3 regulation of adipokine expression." Obesity (Silver Spring) **15**(2): 340-348.

Sun, X. and M. B. Zemel (2008). "Calcitriol and calcium regulate cytokine production and adipocyte-macrophage cross-talk." J Nutr Biochem **19**(6): 392-399.

Takeda, K., T. Kaisho and S. Akira (2003). "Toll-like receptors." Annu Rev Immunol **21**: 335-376.

Tanaka, Y. and H. F. DeLuca (1983). "Stimulation of 1,25-dihydroxyvitamin D3 production by 1,25-dihydroxyvitamin D3 in the hypocalcaemic rat." Biochem J **214**(3): 893-897.

Tangpricha, V., P. Koutkia, S. M. Rieke, T. C. Chen, A. A. Perez and M. F. Holick (2003). "Fortification of orange juice with vitamin D: a novel approach for enhancing vitamin D nutritional health." Am J Clin Nutr **77**(6): 1478-1483.

Theodoropoulos, C., C. Demers, J. L. Petit and M. Gascon-Barre (2003). "High sensitivity of rat hepatic vitamin D3-25 hydroxylase CYP27A to 1,25-dihydroxyvitamin D3 administration." Am J Physiol Endocrinol Metab **284**(1): E138-147.

Thompson, G. R., B. Lewis and C. C. Booth (1966). "Absorption of vitamin D3-3H in control subjects and patients with intestinal malabsorption." J Clin Invest **45**(1): 94-102.

Tilg, H. and A. R. Moschen (2006). "Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity." Nat Rev Immunol **6**(10): 772-783.

Trayhurn, P. (2013). "Hypoxia and adipose tissue function and dysfunction in obesity." Physiol Rev **93**(1): 1-21.

Uematsu, S. and S. Akira (2006). "Toll-like receptors and innate immunity." J Mol Med (Berl) **84**(9): 712-725.

Vaisse, C., J. L. Halaas, C. M. Horvath, J. E. Darnell, Jr., M. Stoffel and J. M. Friedman (1996). "Leptin activation of Stat3 in the hypothalamus of wild-type and ob/ob mice but not db/db mice." Nat Genet **14**(1): 95-97.

Vimaleswaran, K. S., D. J. Berry, C. Lu, E. Tikkanen, S. Pilz, L. T. Hiraki, J. D. Cooper, Z. Dastani, R. Li, D. K. Houston, A. R. Wood, K. Michaelsson, L. Vandenput, L. Zgaga, L. M. Yerges-Armstrong, M. I. McCarthy, J. Dupuis, M. Kaakinen, M. E. Kleber, K. Jameson, N. Arden, O. Raitakari, J. Viikari, K. K. Lohman, L. Ferrucci, H. Melhus, E. Ingelsson, L. Byberg, L. Lind, M. Lorentzon, V. Salomaa, H. Campbell, M. Dunlop, B. D. Mitchell, K. H. Herzig, A. Pouta, A. L. Hartikainen, E. A. Streeten, E. Theodoratou, A. Jula, N. J. Wareham, C. Ohlsson, T. M. Frayling, S. B. Kritchevsky, T. D. Spector, J. B. Richards, T. Lehtimäki, W. H. Ouwehand, P. Kraft, C. Cooper, W. Marz, C. Power, R. J. Loos, T. J. Wang, M. R. Jarvelin, J. C. Whittaker, A. D. Hingorani and E. Hyppönen (2013). "Causal relationship between obesity and vitamin D status: bi-directional Mendelian randomization analysis of multiple cohorts." PLoS Med **10**(2): e1001383.

vinh quoc Lu'o'ng, K. and L. T. Nguyen (2013). "The beneficial role of vitamin D in obesity: possible genetic and cell signaling mechanisms." Nutr J **12**: 89.

Wamberg, L., U. Kampmann, H. Stodkilde-Jorgensen, L. Rejnmark, S. B.

Pedersen and B. Richelsen (2013). "Effects of vitamin D supplementation on body fat accumulation, inflammation, and metabolic risk factors in obese adults with low vitamin D levels - results from a randomized trial." Eur J Intern Med **24**(7): 644-649.

Wang, T. J., F. Zhang, J. B. Richards, B. Kestenbaum, J. B. van Meurs, D. Berry, D. P. Kiel, E. A. Streeten, C. Ohlsson, D. L. Koller, L. Peltonen, J. D. Cooper, P. F. O'Reilly, D. K. Houston, N. L. Glazer, L. Vandenput, M. Peacock, J. Shi, F. Rivadeneira, M. I. McCarthy, P. Anneli, I. H. de Boer, M. Mangino, B. Kato, D. J. Smyth, S. L. Booth, P. F. Jacques, G. L. Burke, M. Goodarzi, C. L. Cheung, M. Wolf, K. Rice, D. Goltzman, N. Hidioglou, M. Ladouceur, N. J. Wareham, L. J. Hocking, D. Hart, N. K. Arden, C. Cooper, S. Malik, W. D. Fraser, A. L. Hartikainen, G. Zhai, H. M. Macdonald, N. G. Forouhi, R. J. Loos, D. M. Reid, A. Hakim, E. Dennison, Y. Liu, C. Power, H. E. Stevens, L. Jaana, R. S. Vasan, N. Soranzo, J. Bojunga, B. M. Psaty, M. Lorentzon, T. Foroud, T. B. Harris, A. Hofman, J. O. Jansson, J. A. Cauley, A. G. Uitterlinden, Q. Gibson, M. R. Jarvelin, D. Karasik, D. S. Siscovick, M. J. Econs, S. B. Kritchevsky, J. C. Florez, J. A. Todd, J. Dupuis, E. Hypponen and T. D. Spector (2010). "Common genetic determinants of vitamin D insufficiency: a genome-wide association study." Lancet **376**(9736): 180-188.

Wang, Y., J. Zhu and H. F. DeLuca (2015). "The vitamin D receptor in the proximal renal tubule is a key regulator of serum 1alpha,25-dihydroxyvitamin D(3)." Am J Physiol Endocrinol Metab **308**(3): E201-205.

Watanabe, Y., Y. Nagai and K. Takatsu (2013). "Activation and regulation of the pattern recognition receptors in obesity-induced adipose tissue inflammation and insulin resistance." Nutrients **5**(9): 3757-3778.

Weber, F. (1981). "Absorption mechanisms for fat-soluble vitamins and the effect of other food constituents." Prog Clin Biol Res **77**: 119-135.

Weisberg, S. P., D. McCann, M. Desai, M. Rosenbaum, R. L. Leibel and A. W. Ferrante, Jr. (2003). "Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue." J Clin Invest **112**(12): 1796-1808.

Werder, M., C. H. Han, E. Wehrli, D. Bimmler, G. Schulthess and H. Hauser (2001). "Role of scavenger receptors SR-BI and CD36 in selective sterol uptake in the small intestine." Biochemistry **40**(38): 11643-11650.

Wintermeyer, E., C. Ihle, S. Ehnert, U. Stockle, G. Ochs, P. de Zwart, I. Flesch, C. Bahrs and A. K. Nussler (2016). "Crucial Role of Vitamin D in the Musculoskeletal System." Nutrients **8**(6).

Wong, S. W., M. J. Kwon, A. M. Choi, H. P. Kim, K. Nakahira and D. H. Hwang (2009). "Fatty acids modulate Toll-like receptor 4 activation through regulation of receptor dimerization and recruitment into lipid rafts in a reactive oxygen species-dependent manner." J Biol Chem **284**(40): 27384-27392.

Wortsman, J., L. Y. Matsuoka, T. C. Chen, Z. Lu and M. F. Holick (2000). "Decreased bioavailability of vitamin D in obesity." Am J Clin Nutr **72**(3): 690-693.

Yamauchi, T., J. Kamon, Y. Minokoshi, Y. Ito, H. Waki, S. Uchida, S. Yamashita, M. Noda, S. Kita, K. Ueki, K. Eto, Y. Akanuma, P. Froguel, F. Foufelle, P. Ferre, D. Carling, S. Kimura, R. Nagai, B. B. Kahn and T. Kadowaki (2002). "Adiponectin stimulates glucose utilization and fatty-acid oxidation by activating AMP-activated protein kinase." Nat Med **8**(11): 1288-1295.

Yoshimura, N., S. Muraki, H. Oka, M. Morita, H. Yamada, S. Tanaka, H. Kawaguchi, K. Nakamura and T. Akune (2013). "Profiles of vitamin D insufficiency and deficiency in Japanese men and women: association with biological, environmental, and nutritional factors and coexisting disorders: the ROAD study." Osteoporos Int **24**(11): 2775-2787.

Yu, S. and M. T. Cantorna (2008). "The vitamin D receptor is required for iNKT cell development." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(13): 5207-5212.

Zhang, X. L., Y. F. Guo, Z. X. Song and M. Zhou (2014). "Vitamin D prevents podocyte injury via regulation of macrophage M1/M2 phenotype in diabetic nephropathy rats." Endocrinology **155**(12): 4939-4950.

Zhang, Y., D. Y. Leung, B. N. Richers, Y. Liu, L. K. Remigio, D. W. Riches

and E. Goleva (2012). "Vitamin D inhibits monocyte/macrophage proinflammatory cytokine production by targeting MAPK phosphatase-1." J Immunol **188**(5): 2127-2135.

Zhang, Y., R. Proenca, M. Maffei, M. Barone, L. Leopold and J. M. Friedman (1994). "Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue." Nature **372**(6505): 425-432.

Zhao, L., S. Zhong, H. Qu, Y. Xie, Z. Cao, Q. Li, P. Yang, Z. Varghese, J. F. Moorhead, Y. Chen and X. Z. Ruan (2015). "Chronic inflammation aggravates metabolic disorders of hepatic fatty acids in high-fat diet-induced obese mice." Sci Rep **5**: 10222.

Zhu, S., S. Park, Y. Lim, S. Shin and S. N. Han (2016). "Korean pine nut oil replacement decreases intestinal lipid uptake while improves hepatic lipid metabolism in mice." Nutr Res Pract **10**(5): 477-486.

Zittermann, A., J. B. Ernst, I. Birschmann and M. Dittrich (2015). "Effect of Vitamin D or Activated Vitamin D on Circulating 1,25-Dihydroxyvitamin D Concentrations: A Systematic Review and Metaanalysis of Randomized Controlled Trials." Clin Chem **61**(12): 1484-1494.

Zittermann, A., S. S. Schleithoff, S. Frisch, C. Gotting, J. Kuhn, H. Koertke, K. Kleesiek, G. Tenderich and R. Koerfer (2009). "Circulating calcitriol concentrations and total mortality." Clin Chem **55**(6): 1163-1170.

Abstract

Effects of Vitamin D Supplementation on Vitamin D Metabolism and Adipose Tissue Inflammation in High-Fat Diet-Induced Obese Mice

Chan Yoon Park

Department of Food and Nutrition

The Graduate School

Seoul National University

Obesity is known to trigger inflammatory response in adipose tissue, leading to metabolic diseases. Also obesity has been reported to be associated with abnormal regulation of several nutrients including vitamin D. Vitamin D is essential for calcium and phosphorus homeostasis and bone mineralization. Vitamin D deficiency is often observed in obese persons and it has been reported that circulating 25(OH)D levels showed inverse correlations with BMI and fat mass. As fat-soluble vitamin D has been found to be stored in adipose tissue, one of the mechanisms suggested for decreased bioavailability of vitamin D was its deposition in adipose tissue. However, since measurement of vitamin D in tissue is difficult and it is hard to control vitamin D synthesis via UVB in human study, only few studies have investigated this mechanism. Obesity also has been associated

with dysregulated serum 1,25(OH)₂D levels, mainly hydroxylated in kidney, and function of 1,25(OH)₂D, locally produced by fat tissue. Both adipocytes and immune cells, components of adipose tissue, express CYP27B1 and VDR. Also 1,25(OH)₂D has been known to affect low-grade chronic inflammation induced by obesity. In this study, we investigated whether obesity could affect vitamin D metabolism and distribution when different levels of dietary vitamin D were provided. Also we studied the effects of vitamin D supplementation on subpopulation of immune cells in adipose tissue and the effects of *in vitro* 1,25(OH)₂D₃ treatment on pro-inflammatory cytokine secretion by stromal vascular cells (SVC) and adipocytes.

In study 1, six-wk-old C57BL/6 mice were fed control (10% kcal fat, CON) or high fat diets (45% kcal fat, HFD) containing three different levels of vitamin D₃ (cholecalciferol); low, control or high vitamin D (50, 1,000, or 25,000 IU/kg of diet, LVd, CVd, or HVd, respectively) for 13 wks. Serum 25(OH)D levels were determined by radioimmunoassay and tissue vitamin D₃ and 25(OH)D₃ levels were measured by LC-MS/MS. The mRNA levels of genes involved in vitamin D absorption (*Mttp*, *Lpl*, *Lrp1*, *Cd36*, *Sr-b1*, *Npc1l1*, and *Abcg1*) in jejunum and 25-hydroxylases (*Cyp2r1* and *Cyp27a1*) in liver were determined by real-time PCR. Overall, dietary vitamin D levels affected serum 25(OH)D levels. However, when 25(OH)D levels were compared between the HFD and CON groups, differential pattern was observed depending on dietary vitamin D levels. When vitamin D intake was at a supplementation level, the HFD_HVd group had lower serum 25(OH)D levels than the CON_HVd group ($P = 0.005$, 19.7% lower). Amount of vitamin D₃ in liver and adipose tissue were greater in the HFD_HVd group than those in the CON_HVd group. Therefore, elevated vitamin D₃ amount in liver

and adipose tissue of HFD_HVd group might have contributed to relatively lower serum 25(OH)D levels of HFD_HVd group. In vitamin D deficient groups, the HFD_LVd group showed higher serum 25(OH)D levels than the CON_LVd group ($P = 0.001$, 76.6% higher). In jejunum, mRNA levels of *Mttp* and *Abca1* were significantly higher and *Cd36* mRNA levels tended to be higher ($P = 0.083$) in the HFD groups compared with CON groups. Thus, it is possible that increased vitamin D absorption in the HFD groups might have contributed to the relatively higher serum 25(OH)D levels in HFD_LVd group.

In study 2, Six-wk-old C57BL/6 mice were fed control or high fat diets containing 10% or 45% calorie fat (CON or HFD) with two different levels of vitamin D₃ (CVd or HVd, 1,000, or 25,000 IU vitamin D₃/kg diet) for 13 wks. Serum 1,25(OH)₂D and PTH levels were determined. Also serum and adipose tissue 25(OH)D₃ levels were measured. The mRNA levels of vitamin D hydroxylases (*Cyp27b1*, *Cyp24a1*) and megalin in kidney, and *Cyp27b1*, *Vdr*, inflammatory chemokines and cytokines in adipose tissue were determined by real-time PCR. Overall, dietary vitamin D supplementation resulted in higher serum 1,25(OH)₂D levels, and renal *Cyp24a1* and *megalyn* mRNA levels. In the CVd groups, serum 1,25(OH)₂D, and PTH levels were higher in the HFD_CVd group compared with CON_CVd group. However in vitamin D supplemented groups, levels of serum 1,25(OH)₂D and PTH were similar between HFD and CON groups, and renal *Cyp27b1* expression level was not affected by HFD feeding. The CON_HVd group showed higher renal *Cyp24a1* mRNA levels, which could be up-regulated by increased 1,25(OH)₂D level, compared with CON_CVd group. However there was no significant difference in renal *Cyp24a1* mRNA level between the HFD_CVd and HFD_HVd groups. Epididymal *Mcp-1* and *Rantes*

mRNA levels were higher in the HFD groups compared with CON groups, and their gene expression levels were down-regulated by vitamin D supplementation. The mRNA expression levels of *Il-6* and *Il-1 β* were also lower in the HVD groups compared with CVd groups. Since the mRNA levels of *Cyp27b1* and *Vdr* were expressed in epididymal adipose tissue, not only circulating 1,25(OH)₂D but also locally produced 1,25(OH)₂D in adipose tissue might have contributed to the amelioration of inflammation in adipose tissue.

In study 3, we investigated whether vitamin D supplementation (1,000 or 10,000 IU/kg of diet, DC or DS) affects subpopulation of adipose tissue-derived immune cells in mice fed a control or high fat diets (10% or 45% kcal fat, CON or HFD) for 13 wks. Subpopulation of immune cells (macrophage, NK cell, CD 4 T cell, CD 8 T cell, B cell) from adipose tissue-derived SVCs were determined by FACS analysis. In order to investigate the anti-inflammatory effects of *in vitro* 1,25(OH)₂D₃ treatment on SVC and adipocyte, five-wk-old C57BL/6 mice were fed control or HFD diets containing 10 or 60% kcal fat(CON or HFD) for 12 wks. Adipocytes and SVCs, isolated from visceral adipose tissue, were cultured with or without 10 nM of 1,25(OH)₂D₃ for 48h and stimulated with LPS during the last 24h. Pro-inflammatory cytokines produced by SVC and adipocytes were measured by ELISA. The mRNA levels of *Tlr2*, *Tlr4*, *Dusp1*, and *Dusp10* were determined in SVC by real-time PCR. The number of macrophages and NK cells within adipose tissue were higher in the HFD groups than CON groups. However, dietary vitamin D did not alter the number of immune cells in adipose tissue. The production of IL-6 and MCP-1 from SVCs and adipocytes were higher in the HFD group compared with CON group. *In vitro* 1,25(OH)₂D treatment decreased IL-6, MCP-1, IL-1 β production by SVC from HFD group and decreased IL-6 production by SVC from

CON group. Likewise, SVC *Tlr2* mRNA levels, which were higher in the HFD group, significantly decreased by *in vitro* 1,25(OH)₂D₃ treatment. The mRNA levels of *Dusp1*, which inhibits MAPK signaling, were increased by *in vitro* 1,25(OH)₂D₃ treatment. However pro-inflammatory cytokine secretion from adipocytes was not affected by *in vitro* 1,25(OH)₂D₃ treatment. These results suggest that activated vitamin D could alleviate pro-inflammatory cytokine production from SVCs by regulating *Tlr2* and *Dusp1* expression levels, although vitamin D supplementation did not inhibit macrophage infiltration into adipose tissue.

In conclusion, obesity increased amount of vitamin D₃ stored in the liver and adipose tissue when vitamin D intake was at a supplementation level, and this might be associated with low serum 25(OH)D levels observed in obesity. Although abnormal elevation of 1,25(OH)₂D and PTH levels induced by obesity, shown in vitamin D control group, was not shown in vitamin D sufficient group, partially altered vitamin D metabolism by obesity was still observed in vitamin D supplemented mice. Furthermore, vitamin D supplementation did not reduce macrophage and NK cell numbers in adipose tissue, but, 1,25(OH)₂D₃ seemed to decrease pro-inflammatory cytokine production from SVCs by regulating *Tlr2* and *Dusp1*.

Keywords: Obesity, vitamin D supplementation, adipose tissue, vitamin D level, 1,25(OH)₂D metabolism, inflammatory response

Student Number: 2014-30124